Freilegung eines säurestabilen Inhibitors durch Thermolysin nach erschöpfender Trypsinbehandlung von Serum und Identifizierung seiner Vorstufe

Marianne-Carola Tisowsky

1980

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

Aus dem biochemischen Laboratorium (Leitung: Prof. Dr. K. Hochstrasser) der Hals- Nasen- Ohrenklinik der Universität München (Direktor: Prof. Dr. H. H. Naumann)

Freilegung eines säurestabilen Inhibitors durch Thermolysin nach erschöpfender Trypsinbehandlung von Serum und Identifizierung seiner Vorstufe

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der Zahnmedizin verfaßt
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Marianne-Carola Tisowsky
aus
Schongau

1980

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. K. Hochstrasser
	Prof. Dr. H. H. Naumann
Dekan:	Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 14. November 1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gliederung

		Seite
I.	EINLEITUNG	1
II.	THEORETISCHER TEIL	9
II. 1.	Beschreibung der Proteaseninhibitoren des Humanplasmas	9
1.1.	Das α_1-Antitrypsin	10
1.2.	Das Antithrombin III	11
1.3.	Der Cl-Inaktivator	11
1.4.	Das α_2-Makroglobulin	13
1.5.	Das α_1-Antichymotrypsin	14
1.6.	Der Inter-alpha-Trypsininhibitor	14
II. 2.	Beschreibung der Verwandtschaftsbeziehungen des Inter-alpha-Trypsininhibitors und seinen physiologischen und künstlichen Derviaten	16
2.1.	Physiologische Derivate des Inter-alpha-Trypsininhibitors	16
2.1.1.	Rückblick	16
2.1.2.	Der physiologische Inhibitor HI-30	18
2.2.	Der künstliche Inhibitor HI-14	19
2.3.	Der künstliche Inhibitor HI-8	23
II. 3.	Inhibitorfreisetzung aus Serum mit Thermolysin	24
3.1.	Fraktionierung des Rinderserums	24
3.2.	Säurelabile Inhibitoren	25
3.3.	Säurestabiler Inhibitor	26
3.4.	Lokalisation des Inter-α-Trypsininhibitors	26
3.5.	Lokalisation des mit Thermolysin freilegbaren Inhibitors	27
3.6.	Gelfiltration der gesuchten neuen Vorstufe des Inhibitors	27

III. ERGEBNIS 28

IV. EXPERIMENTELLER TEIL 33

1. Vorbereitung des Rinderserums 33
2. Vorbereitung der Chromatographiesäule 33
3. Vorbereitung des Endpuffers 33
4. Der Trypsin-Hemmtest 33
5. Versuchsdurchführung 34

V. DISKUSSION 46

VI. ZUSAMMENFASSUNG 47

Literaturverzeichnis 48

I. EINLEITUNG

Die Proteasen sind, neben den Amylasen, die wohl wichtigsten und am längsten bekannten hydrolytischen Enzyme. Da sie die hydrolytische Spaltung von Peptidbindungen katalysieren, werden sie in der systematischen Nomenklatur unter die C-N-Hydrolasen eingereiht (1).
Extrazellulär kommen die meisten Proteasen im Gastrointestinaltrakt vor: Im Magen beginnt die Proteinspaltung mit Pepsinen, die bevorzugt vor und hinter Phenylalanin und Tyrosin die Peptidbindung spalten. Es bleiben Polypeptide verschiedener Größe übrig. Da das pH-Optimum der Pepsine im stark sauren Bereich liegt, werden sie bei Durchmischung des Mageninhaltes mit dem alkalischen Pancreassaft im Duodenum inaktiviert. Im Dünndarm werden die Polypeptide dann durch die Wirkung der hochaktiven proteolytischen Enzyme Trypsin und Chymotrypsin weiter zu Poly- und Dipeptiden gespalten. Daneben kommen mit dem Pancreassaft auch Elastase und Kollagenase in den Darm, die Faserproteine spalten können.
Die kleineren Bruchstücke der Eiweißverdauung werden schließlich durch die Pancreas-Carboxypeptidase und die intestinalen Di- und Aminopeptidasen in die einzelnen Aminosäuren aufgespalten (2) .
Etwa 15 % des mit der Nahrung aufgenommenen Proteins erreicht den Dickdarm und wird hier durch Bakterieneinfluß verändert. Die Proteasen aus Bakterien katalysieren die Hydrolyse aller Proteine, die Reaktion verläuft jedoch sehr langsam. Trypsin und Chymotrypsin spalten Peptidbindungen nur zwischen bestimmten Aminosäuren, dafür aber mit hoher Geschwindigkeit.
Die Bildung der hochwirksamen proteinspaltenden Pancreasenzyme Trypsin und Chymotrypsin erfolgt in Form ihrer inaktiven Vorstufen (s.u.). Bei Pancreatitis kann es zur Aktivierung der Pancreasenzyme und damit zur Selbstverdauung des Pancreasgewebes kommen (2,3).

Intrazelluläre Proteasen werden zu den Kathepsinen gerechnet (57). In den Gewebszellen sind diese proteolytischen Enzyme an die Zellorganellen gebunden: Die Lysosomen enthalten z.B.

eine Vielzahl hydrolytischer Enzyme, wie Phosphatasen, Ribonucleasen, Lipasen, Proteasen u.a. (7, 8). Alle lysosomalen Enzyme zeigen ihre höchste Aktivität im sauren pH-Bereich. Durch die Hüllmembran des Lysosoms sind die Enzyme von ihren Substraten getrennt. Bei Zerstörung dieser Barriere werden die Enzyme freigesetzt, worauf die Auflösung der Zelle erfolgt (Selbstverdauung). Besonders lysosomenreich sind die Zellen der Leber, der Nieren und die Zellen, die der Infektabwehr dienen: unter den Leukozyten sind vor allem die neutrophilen Granulocyten reich an Hydrolasen (Proteasen, Lysozym), da sie die Aufgabe haben phagocytiertes Material abzubauen. Beim Zerfall der Leukozyten werden dann diese Enzyme in die Umgebung freigesetzt, ohne ihre proteolytische Aktivität zu verlieren.

Aufgrund ihres Angriffsortes an den Proteinen kann man die Proteasen einteilen (1):

1. Die Exopeptidasen (syn. Peptidasen): Mit diesen Enzymen können Peptidketten vom C-terminalen oder N-terminalen Ende aus schrittweise abgebaut werden. Diese Carboxypeptidasen und Aminopeptidasen bewirken vor allem Oligo- und Polypeptide.

2. Die Endopeptidasen (syn. Proteinasen): Es werden bestimmte Peptidbindungen im Innern der Aminosäurekette aufgespalten.

Viele Endopeptidasen sind spezifisch, d.h. sie spalten nur zwischen bestimmten Aminosäuren die Peptidkette, aber dafür mit hoher Geschwindigkeit.

<u>Trypsin</u> spaltet nur Peptidbindungen an der Carboxylgruppe der geladenen, hydrophilen Aminosäuren Arginin und Lysin.

<u>Chymotrypsin</u> besitzt ein breiteres Wirkungsspektrum.

<u>Pepsin</u> spaltet bevorzugt vor und hinter den Aminosäuren Tyrosin und Phenylalanin.

Im Stoffwechselgeschehen gibt es verschiedene Regulationsmechanismen, die auf der Wirkung von Proteasen beruhen, z.B.:

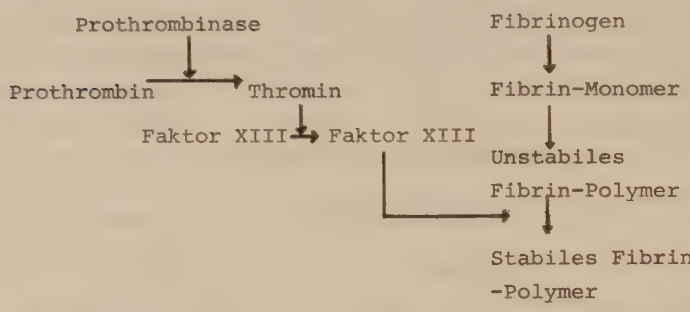
1. Enzymaktivierung: Bestimmte Enzyme, insbesondere Proteasen, werden zuerst als enzymatisch inaktive Proteine synthetisiert, als solche gespeichert und bei Bedarf sezerniert. Am Ort ihrer Wirkung werden diese Proenzyme durch enzymkatalysierte Abspaltung eines Teiles ihrer Peptidkette in die aktiven Enzyme überführt. Zum Teil wird die Überführung der inaktiven Vorstufe in das aktive Enzym auch durch eine kleine Menge des aktiven Enzyms selber katalysiert (autokatalytische Aktivierung):

Trypsinogen	$\xrightarrow{\text{Trypsin, Enterokinase}}$	Trypsin
Prothrombin	$\xrightarrow{\text{Ca, Thrombokinase}}$	Thrombin
Pepsinogen	$\xrightarrow{H^+\text{, Pepsin}}$	Pepsin
Chymotrypsinogen	$\xrightarrow{\text{Trypsin}}$	Chymotrypsin
Procarboxypeptidase	$\xrightarrow{\text{Enterokinase}}$	Carboxypeptidase
Plasminogen	$\xrightarrow{\text{verschied. Aktivatoren}}$	Plasmin

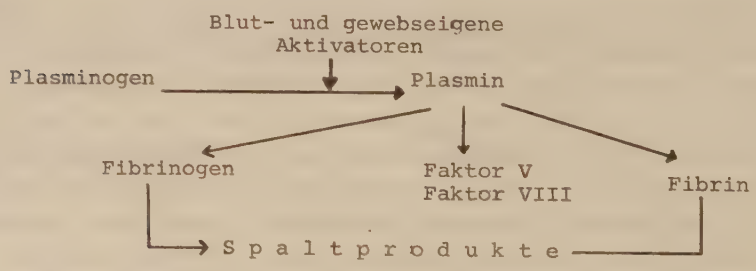
Die Proenzymbildung gibt der Zelle die Möglichkeit, ausreichend Enzym auf Vorrat zu bilden, ohne daß diese äußerst aktiven Enzyme an ungeeigneter Stelle ihre Wirkung entfalten (Gefahr der Selbstverdauung) (2).

2. Blutgerinnung und Fibrinolyse: Beides sind enzymatisch regulierte Vorgänge, die ständig nebeneinander im strömenden Blut ablaufen. Normalerweise stehen sie miteinander im Gleichgewicht.
Entscheidend für die Thrombinbildung ist die Überführung des Gerinnungsfaktors X (Stuart-Prower-Faktor) in eine aktive Form, die mit dem Faktor V, Calcium und Phospholipiden einen Komplex mit enzymatischer Aktivität bildet, der - als Prothrombinase bezeichnet - die Umwandlung von Prothrombin in Thrombin katalysiert. Das Substrat von Thrombin ist das Fibrinogen, von dem

kleine Bruchstücke abgespalten werden. Dadurch werden im Fibrinogenmolekül Bezirke freigelegt, die eine Zusammenlagerung der entstandenen Fibrin-Monomeren zu Polymeren erlauben. Die endgültige Festigkeit erhält das frisch gebildete Fibringerinnsel erst durch die Wirkung des Faktors XIII, - der Fibrin-stabilisierende - F. - der durch Thrombin aktiviert wird (2).



Mit Hilfe des Fibrinolytischen Systems wird nicht mehr benötigtes Fibrin aufgelöst. Die Endopeptidase Plasmin wird aus ihrer inaktiven Vorstufe Plasminogen gebildet. Als Aktivatoren kommen in Betracht: bluteigene und gewebseigene Aktivatoren. Plasmin baut nicht nur Fibrin ab, sondern greift auch Fibrinogen und die Faktoren V und VIII an. Die entstehenden Fibrinogenspaltprodukte hemmen die Thrombinbildung (2).

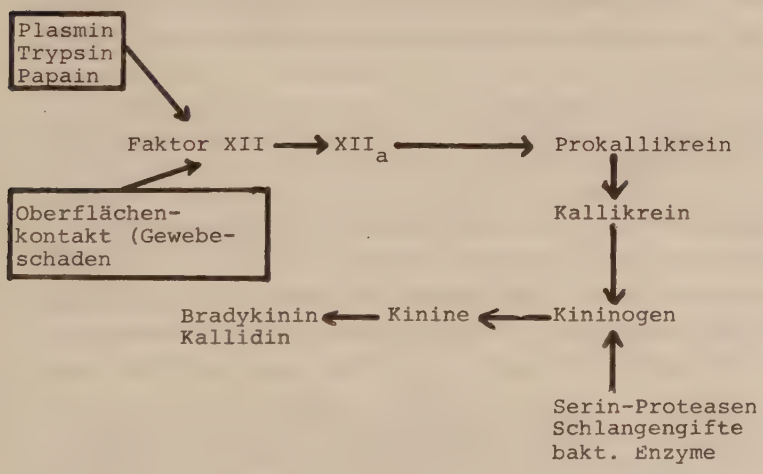


3. Angiotensin:

Aus den Produktionszellen freigesetztes Renin, ein hochspezifisches, proteolytisches Enzym, bewirkt im Blutplasma die Abspaltung des Dekapeptids Angiotensin I aus dem Angiotensinogen. Vom Angiotensin I wird durch eine Peptidase, die entweder im Blutplasma als "converting Enzyme" oder in den Lungenkapillaren vorkommt, zwei Aminosäuren abgespalten, so daß das aktive Hormon Angiotensin II entsteht.
Angiotensin II wird im Blutplasma durch eine Gruppe proteolytischer Enzyme (Trypsin, Chymotrypsin, Leucin-Aminopeptidase und Pepsin) zu inaktiven Peptiden abgebaut (2).

4. Kallikrein-Kinin-System:

Die Kinine werden aus Kininogen, einem spezies-spezifischen, in der Leberzelle synthetisierten α_2-Globulin durch die Kallikreine freigesetzt. Diese entstehen aus ihren Proenzymen und kommen im Blutplasma, den Granulocyten, Speichel-, Tränen- und Schweißdrüsen sowie Nieren, Pankreas und Darm vor. Die Aktivierung des Prokallikreins ist an die Gegenwart des Faktors XII gebunden (6):



Proteaseninhibitoren

Überall dort, wo in einem Organismus Proteasen vorkommen, stehen ihnen natürliche Antagonisten, die Proteaseninhibitoren, entgegen. Es handelt sich dabei entweder um hochmolekulare Proteine oder auch um relativ niedermolekulare Polypeptide. Sie besitzen die Fähigkeit, die verschiedenen proteolytisch wirkenden Enzyme wie Trypsin, Chymotrypsin, Kallikrein, Plasmin, Thrombin und Proteasen aus Leukozyten, Bakterien und Pilzen in ihrer Aktivität zu blockieren. Die Proteaseninhibitoren kommen in Gewebsflüssigkeiten, in Geweben und Organen, besonders in Drüsen vor. Sie wurden isoliert und charakterisiert. Verschiedene proteolytische Enzyme wurden in den Granula der Leukozyten entdeckt.

Während pathologischer Vorgänge mit eitrigen Infektionen oder bei Abszedierungen kommt es zur massiven Leukozytenemigration in das entzündliche Gewebe mit anschließendem Zerfall der Leukozyten und damit zu einer starken Proteasenfreisetzung. Die physiologischerweise vorhandenen Proteaseninhibitoren reichen normalerweise aus, die freigesetzten proteolytischen Enzyme zu inaktivieren. Wenn jedoch die Proteasenfreisetzung die Inhibitorkapazität übersteigt, kommt es zur Einschmelzung körpereigenen Gewebes (13).

Experimentell konnte nachgewiesen werden, daß das Lungenparenchym von Leukozytenproteasen angedaut werden kann (31). Durch Applikation verschiedener Proteasen über die Atemluft konnten Lungenemphyseme künstlich erzeugt werden. Bei Personen, die proteasenhaltigem Staub ausgesetzt sind, wie Arbeiter der Detergentienindustrie (Waschmitteln werden oft proteolytische Enzyme zugesetzt) konnte ebenfalls eine Emphyseminduktion beobachtet werden (32,33).

Proteaseinhibitoren sind unter anderem auch beim Abbau des Kollagens beteiligt. Die Kollagenfibrillen vieler Säugetiere besitzen eine relativ lange Halbwertszeit. In bestimmten Situationen wird Kollagen jedoch schneller abgebaut, wie z.B. bei der postpartalen Involution des Uterus, bei der Wundheilung und im

alternden Gewebe. Der Kollagenabbau erfolgt durch Kollagenase, die in Bindegewebszellen gebildet und in den Extrazellularraum secerniert wird. Die Sekretion erfolgt wahrscheinlich entweder als Kollagenase, die durch Proteaseinhibitoren gehemmt wird und deren Hemmung bei Bedarf aufgehoben wird, oder als Prokollagenase, die im Extrazellulärraum noch aktiviert werden muß. Pathologischerweise ist der Kollagenumsatz erhöht bei Arthritis, bei Akromegalie, bei Knochenerkrankungen und bei primärem Hyperparathyreoidismus (2).

Man sollte festhalten, daß alle Proteinaseinhibitoren des menschlichen Plasmas Glykoproteine sind. Es gibt zwar bisher keine Anzeichen dafür, daß der Kohlenhydratanteil für die Inhibitorfunktion wichtig wäre, er könnte aber für den Transport durch die Zellwand von Bedeutung sein (9).

Reaktionsmechanismus der Hemmung:

Die enzymatische Proteolyse ist eine Reaktionsfolge:
Zunächst geht das proteolytische Enzym mit dem zu spaltenden Protein eine Komplexverbindung ein. Im Komplex wird das Substrat hydrolysiert, wobei Proteinbruchstücke entstehen und die Protease wieder freigesetzt wird. Bei der Hemmung bildet die Protease mit dem Inhibitor eine Komplexverbindung. Die anschließende Hydrolyse des Moleküls mit Freisetzung der aktiven Protease erfolgt jedoch nicht. Die Protease bleibt an den Inhibitor gebunden, wird acyliert und ist damit für die Spaltung weiterer Proteine blockiert (10).

Bemerkenswert ist die Eigenschaft der Proteaseinhibitoren physiologischerweise in den extravasculären Raum zu diffundieren. Unter pathologischen Bedingungen kann diese Abwanderung von mehreren Faktoren beeinflußt sein:
z.B. kann Erhöhung der Gefäßpermeabilität die Normalsituation völlig verändern (11). Die hohe molare Plasmakonzentration des α_1-Antitrypsins unterstreicht die generelle klinische Wichtigkeit dieses "Inhibitorshiftings" in den extravasculären Raum.

1. LAURELL und ERIKSON (12, 13, 14) beschrieben erstmals 1969 das gemeinsame Auftreten von Lungenemphysem und erblichen Mangel an α_1-Antitrypsin. Bei Reduktion des α_1-Antitrypsingehaltes auf 10 % des Normalwertes entwickelt sich mit hoher Wahrscheinlichkeit bereits im 4. Lebensjahrzehnt ein chronisch obstruktives Lungenemphysem. Eine Erklärung für diesen Zusammenhang wurde aus der biochemischen Wirkung des α_1-Antitrypsins abgeleitet. Dieser Proteaseninhibitor hemmt neben Trypsin, Chymotrypsin, Plasmin und Kallikrein auch leukozytäre Proteasen. Die lysosomalen Leukozytenproteasen haben die Aufgabe, das phagozytierte Material abzubauen. Beim Zerfall der Leukozyten werden sie in die Umgebung freigesetzt, ohne dabei ihre proteolytische Aktivität zu verlieren. Aufgrund dieser Beobachtungen wird eine gesteigerte Proteolyse als Ursache der Atemwegsobstruktionen angesehen.

2. Neben dem chronisch obstruktivem Lungenemphysem wurden auch Lebererkrankungen im Kindesalter in Zusammenhang mit α_1-Antritrypsinmangel beobachtet.

3. Bei niedrigem Serumspiegel des C-1-Esteraseinhibitors wurde das Auftreten von angoineurotischen Ödemen beobachtet (OSLER 1888, 15, 16, 17)

4. Die Bildung von zu hohen Mengen freien Plasmins im Blut wird durch Proteine mit Antiplasminaktivität wie dem α_2-Makroglobulin, dem Antithrombin III und dem α_1-Antitrypsin verhindert. Eine pathologisch gesteigerte Fibrinolyse (z.B. bei Leukämien) kann durch Antifibrinolytika wie z.B. auch Trasylol oder ε-Aminocapronsäure, die außer Plasmin auch Trypsin Chymotrypsin und die in erster Linie für die Kininfreisetzung verantwortlichen Kallikreine hemmen (2).

II. THEORETISCHER TEIL

II.1. Beschreibung der Proteasen-Inhibitoren des Humanplasmas

Schon im Jahre 1970 waren sechs verschiedene Proteaseninhibitoren des Plasmas bekannt und charakterisiert (9):

1. α_1-Antitrypsin (α_1-A)
2. Antithrombin III (AT III)
3. C1 Inaktivator (C1 INA)
4. α_2-Makroglobulin (α_2-M)
5. α_1-Antichymotrypsin (α_1-X)
6. Inter-alpha-Trypsininhibitor (III)

Drei Jahre später, 1973, stellte MILLER-ANDERSON et al. einen neuen Thrombininhibitor vor (34):
Er stellt ein konjugiertes Protein dar, das im Humanplasma die gleiche Beweglichkeit der ß-Globuline zeigt. Trombin wird augenblicklich neutralisiert und im Gegensatz zu AT III wird dieser Inhibitor durch Heparin inaktiviert. Es scheint sehr wahrscheinlich zu sein, daß dieser hochmolekulare Inhibitor mit dem ß-Lipoprotein identisch ist. Die Eigenschaft der Lipoproteine Thrombin zu neutralisieren, wurde zum ersten Mal von LOEB (35) beobachtet.

Zusätzlich zu den Proteaseninhibitoren existieren im Plasma noch Inhibitoren, die Enzymaktivierung aus Proenzymen kontrollieren. Schon viele Jahre lang wurde die Existenz von Inhibitoren vermutet (35, 36, 37, 38, 39, 40), die auf die Aktivatoren des Plasminogens einwirken können. Plasmiogen ist immerhin die Vorstufe der stärksten Plasmaprotease, so daß Inhibitoren hier von sehr großem Interesse sind. Tatsächlich gelang es ULLA HEDNER, Malmö, einen der Inhibitoren der Plasminogenaktivierung zu isolieren und teilweise zu charakterisieren (41, 42). Das Vorhandensein solcher Inhibitoren bedeutet einen Regulationsmechanismus zwischen Blutgerinnung und Fibrinolyse.

Die Proteaseninhibitoren des Plasmas sind im Organismus weit verbreitet. Sie wurden in Körperflüssigkeiten, in Geweben und in Organen, besonders in Organen mit sekretorischer Leistung beobachtet. Es ist bemerkenswert, daß sie dort in anderen Erscheinungsformen vorliegen, verglichen mit denen im Plasma. Als Beispiel soll das Vorkommen und die Eigenschaften von inhibitorisch aktiven Derivaten des ITI gezeigt werden (20):

1. Harninhibitor (ASTRUP)	2. Humanserum ITI (HOCHSTRASSER)
Hitze- und Säurestabil, Sialinsäurehaltig mit einem MG von 16 000 = Mingin Sialinsäurefrei = Minginin (58)	Im Plasmaüberstand nach Behandlung mit Perchlorsäure: 2 säurestabile Inhibitoren mit MG von 22 000 und 44 000 (14)

Von den Proteaseninhibitoren des Plasmas zeigte sich mittlerweile, daß α_1-A und α_2-M zu den Wichtigsten gehören, was sowohl ihre Konzentration im Plasma als auch ihre Spezifität anbelangt. Die anderen Inhibitoren finden sich lediglich in geringeren Mengen (9).

II.1.1. Das α_1-Antitrypsin (α_1-A)

Das α_1-A stellt im Serum den Hauptanteil der α_1-Globulinfraktion. Es hat einen Kohlenhydratanteil von 12 % und ein MG von ca. 45 000. 90 % der im Blutplasma feststellbaren antitryptischen Aktivität entfallen auf diesen Inhibitor. Der polyvalente Inhibitor vermag neben dem Pankreasenzymen Trypsin, Chymotrypsin und Kallikrein auch leukozytäre und akrosomale Proteasen, sowie Bakterien- und Pilzproteasen zu hemmen (10). Es ist der einzige Inhibitor, von dem genetische Varianten bekannt sind, die zu klinischer Bedeutung kamen. LAURELL und PERSSON stellten

eine Methode vor, die die Mikrounterschiede deutlich macht (18). α_1-A und die Derivate des ITI sind Wegbereiter von Entzündungen: sie greifen Basalmembranen an und sind verantwortlich für die Destruktion, die das Lungenemphysem charakterisiert. Aufgrund des breiten Wirkungsspektrums ist das α_1-A bei allen klinischen Krankheitsbildern vermindert, die durch Proteasenverbrauch gekennzeichnet sind. Es konnte gezeigt werden, daß die Höhe des α_1-A Spiegels mit der Schwere der Erkrankung korreliert (19). Im Sekret des oberen Respirationstraktes liegt im physiologischen Zustand der Anteil der antiproteolytischen Aktivität, der auf das α_1-A zurückzuführen ist, bei etwa 15 - 20 %. Dieser Prozentsatz kann jedoch bei pathologischen Zuständen durch erhöhte Transsudation bis auf ca. 60 % ansteigen. HOCHSTRASSER et al. konnten zeigen, daß das α_1-A im distalen Teil des Respirationstraktes ausschließlich den Schutz vor freien Proteasen übernimmt (43).

II.1.2. Das Antithrombin III (AT III)

Es hat ein MG von 65 000 und einen Proteinanteil von 85 % (2). Es ist der Hauptinhibitor des Thrombins im Humanplasma und inaktiviert den Gerinnungsfaktor X_a. Der Faktor Xa ist eine Protease, die in Gegenwart von Phospholipiden und Calciumionen die Aktivierung von Prothrombin zusammen mit Faktor V katalysiert. Nachdem Faktor V an Faktor Xa gebunden ist, scheint Faktor Xa gegenüber der Inaktivierung durch AT III geschützt zu sein (20). Das AT III hemmt außerdem noch Akrosin, ein trypsinähnliches Enzym der Spermatozoen.

II.1.3. Der C1-Inaktivator (C1 INA)

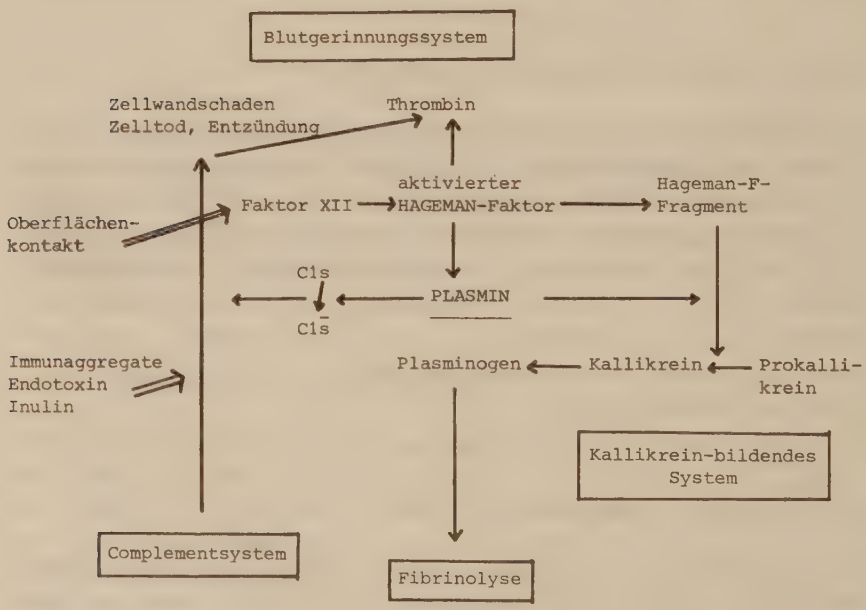
Bei der Aktivierung zahlreicher biologischer Systeme im Plasma steigt proteolytische Aktivität an: meist sind mehrere Proteasen für die ganze Reaktionsfolge notwendig.

In der klassischen Reihenfolge des Complement-Systems sind schon 4 verschiedene Proteasen bekannt: C1r, C1s, C3-Konvertase

und die C3 abhängige Peptidase. Nur von den ersten 2 Enzymen weiß man, daß sie spezifisch von einem Plasmainhibitor gehemmt werden, dem C1 INA. Für die anderen beiden Enzyme konnte bisher noch kein Inhibitor des Plasmas gefunden werden (6).
Der C1 INA spielt auch im Blutgerinnungssystem eine bedeutende Rolle: er inaktiviert die Faktoren XII und XI.

Der Faktor XII (oder Hageman Faktor) seinerseits kontrolliert 4 wichtige Enzymsysteme: Blutgerinnung, Fibrinolyse, die Kallikrein- und Complementaktivierung. Der Hemmechanismus des C1 INA mit dem Hageman Faktor ist noch ungeklärt; es wird eine enzymatische Interaktion diskutiert (9).

aus (9)



Die konventionelle Form des erblichen angioneurotischen Ödems ist durch einen extrem niedrigen Serumspiegel des C1 INA charakterisiert. DONALDSON und EVANS (45) beschrieben diesen Befund als erste.

II.1.4. Das α_2-Markoglobulin (α_2-M)

Das α_2-M stellt in der α_2-Globulinfraktion einen sehr großen Anteil. Es hat einen Kohlenhydratanteil von ca. 10 % und besitzt ein MG von ca. 820 000.
Die Hemmwirkung des α_2-M erstreckt sich auf alle Endopeptidasen, auf die Carboxylpeptidase aus der Klasse der Exopeptidasen und auf einige andere Enzyme (9).
Wie andere Proteaseninhibitoren geht das α_2-M nur Verbindungen mit aktiven Proteasen ein. Die Wechselwirkung beruht auf einem "scheinbar irreversiblen" Typ und zwar auf einer molaren Basis von 1:2 (5).
Exopeptidase und die Nicht-Peptidasen Aspartat-Aminotransferase und Phytohaemagglutinine werden nur sehr locker und reversibel über elektrostatische Wechselwirkung gebunden. Dies geschieht vorzugsweise am Kohlenhydratanteil des α_2-M.

RINDERKNECHT und GOOKAS (21) konnten jetzt bestätigen, daß Trypsinogen und Chymotrypsinogen über einen Trypsin- α_2-M-Komplex aktiviert werden können; die Umsatzrate ist jedoch nur halb so hoch als mit freiem Trypsin.

Eine andere wichtige Eigenschaft des α_2-M ist seine Wirkung als Plasmininhibitor. Im Verlauf einer fibrinolytischen Therapie verbindet es sich mit dem Plasminogen, während die anderen Proteaseninhibitoren davon unbeeinflußt bleiben. Während einer Langzeittherapie wird das gesamte Plasminogen gebunden und man kann anscheinend davon ausgehen, daß die Kapazität des α_2-M für alles verfügbare Plasminogen ausreicht (9).

Im Gegensatz zu einer konventionellen Proteasenreaktion mit dem Inhibitor bleibt im Komplex mit α_2-M eine Restaktivität bestehen, die sich aber nur gegen Moleküle einer definierten Größe

richtet. Deshalb ist ein anderer Hemmechanismus hier zu fordern:
BARRETT und STARKEY (5) stellten dazu folgende Theorie vor:
Die Protease legt sich an das Makromolekül an, findet eine geeignete Stelle in der Peptidstruktur, die globuläre Anteile des Moleküls verbindet, und die Bildung eines α_2-M-Enzymkomplexes unter Abspaltung eines Peptids beginnt. Dabei wird an der Anlagerungsstelle eine Konformationsänderung induziert. Als Resultat davon ist es für die Protease unmöglich sich zu befreien oder durch eine andere Protease ersetzt zu werden: sie ist irreversibel gefangen, ohne daß eine Umwandlung einer kovalenten Bindung nötig war. Nur Moleküle einer definierten Größe können zu der "gefangenen" Protease gelangen. Aus dieser Bindung kann die Protease nur mittels denaturierender Agentien wieder befreit werden.
Der so gebildete Komplex wird schließlich sehr schnell eliminiert, da er wie fremdes Protein angesehen wird. Zusammenfassend läßt sich sagen, daß α_2-M wirklich eines der hauptsächlichen Schutzproteine des Humanplasmas ist.

II.1.5. Das α_1-Antichymotrypsin (α_1-X)

Es besitzt ein MG von ca. 68 000 und einen Kohlenhydratanteil von 28 % (2). Bisher ist nur bekannt, daß es Chymotrypsin hemmt: es gilt daher als "exklusiver" Inhibitor.

II.1.6. Der Inter-alpha-Trypsininhibitor

Er hat ein Molekulargewicht von ca. 180 000. Bei der Elektrophorese des Serums liegt er zwischen der α_1- und α_2-Globulinfraktion. Der hochmolekulare Inhibitor ist sehr sensitiv gegen Proteasen in vivo, so daß er in Bruchstücke zerfällt:

Man fand bei der Immunelektrophorese mit älteren Lösungen des ITI zahlreiche Präzipitationslinien in verschiedenen Positionen (14).

Die Bruchstücke des ITI reagieren alle noch mit dem spezifischen Antiserum, allerdings sind die Präzipitate gegenüber demjenigen der Reinsubstanz verschoben. Der ITI ist ein Argininhibitor. Er hemmt die proteolytischen Enzyme Trypsin, Chymotrypsin und Plasmin, jedoch keine leukozytären Proteasen (22).
HOCHSTRASSER et al. gelang die Charakterisierung des ITI als ein big-Kunitz-type Inhibitor (48, 49).
Als eines der am besten untersuchten Beispiele für die Interaktion zwischen Proteinen ist das System Protease-Proteinprotease Inhibitor zu nennen. Der erste Proteaseinhibitor, dessen Aminosäurensequenz aufgeklärt wurde, war der BPTI (basic pancreatic trypsin inhibitor), aus verschiedenen Geweben des Rindes. Er gilt als typischer Kunitz-type Inhibitor (48, 49).
Das gleiche Konzept des Mechanismus der Wechselwirkung Protein-Proteaseinhibitor ist sehr wahrscheinlich auch die Erklärung für die Komplexformation der Kazal-type-Inhibitoren mit Proteasen. Kunitz-type und Kazal-type Inhibitoren unterscheiden sich in der charakteristischen Aminosäurensequenz am aktiven Zentrum und in der Lokalisierung der 3 Disulfidbrücken. In einem Bereich von etwa 60 Gliedern ähneln sich zudem die Aminosäurenketten beider Inhibitoren.
Höhermolekulare Inhibitoren wurden bisher nur als Kazal-type Inhibitoren identifiziert, die aus 2 oder 3 kovalent verbundenen Kazal-type Domains zusammengesetzt sind (48, 49).
Der Ausdruck"Domain" bezeichnet diejenige Aminosäurenseuqenz, die für die inhibitorische Aktivität des Inhibitors zuständig ist.

Vom ITI wie auch aus seinem physiologischen Derivat kann durch kurzzeitige Behandlung mit Trypsin im Überschuß ein Inhibitor mit einem app. Molekulargewicht von 14 000 freigesetzt werden. Nach Bestimmung der Aminosäurensequenz dieses "künstlichen" Derivates wurde festgestellt, daß er aus 2 kovalent verbundenen Kunitz-type Domains besteht (46). Deshalb glauben HOCHSTRASSER et al. daß der ITI damit als der erste hochmolekulare Proteaseinhibitor als "big-Kunitz-type" Inhibitor zu definieren ist (49).

II.2. Beschreibung der Verwandtschaftsbeziehungen zwischen dem Inter-alpha-Trypsininhibitor und seinen physiologischen und künstlichen Derivaten.

Aus dem hochmolekularen, humoralen, säurelabilen ITI werden durch limitierte Proteolyse die identischen säurestabilen Inhibitoren des Humanserums und -Harns in vivo freigesetzt (48). Dieser Inhibitor hat ein Molekulargewicht von ca. 30 000 (Human inhibitor app. MG von 30 000 = HI-30) und wird durch die Nieren ausgeschieden.

Über die Trypsin-Inhibitorkomplexe können diese säurestabilen Inhibitoren und auch der ITI zu einem niedermolekularen Inhibitor abgebaut werden. Dieser Inhibitor hat ein Molekulargewicht von ca. 14 000 (Human inhibitor app. MG von 14 000 = HI-14) und zeigt noch inhibitorische Aktivität.

Behandelt man den nativen oder denaturierten ITI, den HI-30 oder den HI-14 längere Zeit (8 Stunden) mit Trypsin, so wird ein Inhibitor freigesetzt, der ein Molekulargewicht von ca. 8 000 hat (HI-8). Dieser Inhibitor zeigt im Gegensatz zu den oben genannten Derivaten des ITI keine immunologische Kreuzreaktion mit dem Antiserum gegen ITI. Seine vollständige Aminosäurensequenz ergab eine ausgeprägte Homologie zu bekannten Kunitz-type Inhibitoren (48, 49).

Die Verwandtschaft dieser Inhibitoren zueinander ist in Abb. 1, S. 19 dargestellt.

II.2.1. Physiologische Derivate des Inter-alpha-Trypsininhibitors

II.2.1.1. Schon lange Zeit war bekannt, daß Humanharn einen säurestabilen, niedermolekularen Trypsininhibitor enthält. Die Gruppe um ASTRUP beschrieb und charakterisierte ihn zuerst (23). Dieses Protein zeichnet sich durch einen Reichtum an Sialinsäure aus; es wurde Mingin genannt und die Sialinfreie Form wurde als Minginin bezeichnet (s. S. 10). Seine Ausscheidung wird von

Hypophysenhormonen kontrolliert, seine Konzentration im Harn ist der Menge an Glucocorticoiden direkt proportional (24).

OROCHSCH und NORDSCHOW (25) berichteten, daß dieser Trypsininhibitor im Harn immunologisch mit dem ITI verwandt ist.

HOCHSTRASSER und seine Mitarbeiter fanden im Sekret des oberen Respirationstraktes antitryptische Aktivität:
20 % der Gesamtaktivität konnten dem α_1-Antitrypsin zugeschrieben werden, die restlichen 80 % waren auf die Anwesenheit zweier säurestabiler, niedermolekularer Inhibitoren mit Molekulargewichten von ca. 20 000 und 24 000 zurückzuführen. Diese beiden Inhibitoren können im Gegensatz zum ITI die Proteasen der Leukozyten inaktivieren. Ihre hauptsächliche physiologische Funktion wäre demnach die Aufrechterhaltung des Gleichgewichtes zwischen Proteasen und Inhibitoren, um u.B. Gewebsnekrosen zu verhindern.
Bei Nachforschungen über die Herkunft der Sekret-Inhibitoren entdeckte HOCHSTRASSER's Gruppe im Überstand von deproteinisiertem Plasma zwei Inhibitoren, die beide dargestellt werden konnten. Die Molekulargewichte der beiden Inhibitoren, die sich als immunologisch verwandt zum ITI herausstellten, wurden mit 22 000 und 44 000 bestimmt. Sie wurden zunächst als Monomeres und Dimeres interpretiert (26, 27, 28, 29, 30). HOCHSTRASSER konnte weiterhin aus Humanharn und denaturiertem Humanserum zwei säurestabile Inhibitoren isolieren, deren Molekulargewicht mit 22 000 und 44 000 angegeben wurden. Jeder dieser Inhibitoren zeigte immunologische Kreuzreaktion mit dem ITI (s. S. 10).

Es wurde auch gezeigt, daß Säuredenaturierung des Plasmas keine Voraussetzung ist, um niedermolekulare Inhibitoren zu isolieren:
Aus nativem Plasma wurden zwei Inhibitoren isoliert, die in ihrer Aminosäurenzusammensetzung, in ihren immunologischen Eigenschaften und in ihren Hemmspektren mit den Inhibitoren aus denaturiertem Plasma identisch sind (14).

II. 2.1.2. Der physiologische Inhibitor HI-30

HOCHSTRASSER, FEUTH und STEINER (30) gelang dann der Beweis, daß die säurestabilen Inhibitoren in Humanharn und -Serum vom hochmolekularen, humoralen und säurelabilen ITI durch limierte Proteolyse abgespalten werden. Die Inhibitoren zeigen immunologische Kreuzreaktion mit gegen ITI gerichteten Antikörpern. Wie HOCHSTRASSER et al. schon früher zeigten (46, 48, 49) besitzt dieser sogenannte "physiologische" Inhibitor das gleiche inhibitorisch aktive Domain wie der native, säurelabile ITI. Weitere Übereinstimmung besteht darin, daß das antitryptisch aktive Domain in beiden Inhibitormolekülen am Carboxylende lokalisiert ist und außerdem strukturell homolog den Kunitz-type Inhiboren ist. Sowohl vom nativen ITI als auch vom physiologischen Inhibitor kann man das inhibitorisch aktive Domain mit Trypsin im Überschuß durch limitierte Proteolyse über den Trypsin-Inhibitorkomplex abspalten (Abb. 1). Man erhält dann den künstlich freigesetzten Inhibitor HI-14.

Eine erhöhte Freisetzung des HI-30 wird im Verlauf verschiedener Erkrankungen beobachtet (50, 51). Deshalb untersuchten HOCHSTRASSER et al. verschiedene Proteasen hinsichtlich ihrer Spaltwirkung auf den ITI um das in vivo wirksame Enzym zu finden. Dabei beobachteten sie, daß offensichtlich die Granulozytenelastase, die bekanntlich bei schweren Entzündungsformen freigesetzt wird, mit Abstand die potenteste aller bislang unteruchten Enzyme bei der Umwandlung des ITI ist. Der ITI wird von der Elastase am schnellsten gespalten (Anfangsgeschwindigkeit der Spaltung bei 1,3 fachem Proteasenüberschuß gegenüber den ITI betrug 4375 nM pro Minute). Unter gleichen Versuchsbedingungen spaltet Trypsin 860 nM pro Minute, Plasmin 67 nM pro Minute und Kallikrein 0,3 nM pro Minute (47). Die hohe Spaltungsgeschwindigkeit der Granulozytenelastase gegenüber dem ITI ist hochinteressant: es besteht ein auffallender Zusammenhang zwischen entzündlichen Prozessen, bei denen Granulozyten zerfallen, und dem erhöhten Serumspiegel und der erhöhten Ausscheidungsrate des HI-30 (50, 51, 52, 53). Diese Beobachtungen sprechen für die Annahme, daß Granulozytenelastase sehr wahrscheinlich an der Freisetzung des physiologi-

schen Inhibitoren aus dem ITI in vivo beteiligt ist (47).

II. 2.2. Der künstliche Inhibitor HI-14

Durch kurzzeitige Behandlung mit Trypsin im Überschuß wird sowohl aus dem nativen oder denaturierten ITI als auch aus dem von ihm abgeleiteten physiologischen säurestabilen HI-30 ein Inhibitor freigesetzt, der ein Molekulargewicht von etwa 14 000 hat und mit gegen ITI gerichteten Antikörpern eine immunologische Kreuzreaktion eingeht. Im Gegensatz zum HI-30, der im Serum frei vorkommt, wurde dieser Inhibitor niemals in der freien Form gefunden. Er liegt an einen Trypsinkomplex gebunden vor. Da die Umwandlung des HI-14 sowohl vom ITI wie auch vom HI-30 nur über einen Trypsin Inhibitorkomplex vor sich geht, und diese Komplexe eine extrem niedrige Dissoziationskonstante besitzen, kann man davon ausgehen, daß der HI-14 kein physiologisches Spaltprodukt des ITI sein kann. Er wird deshalb als künstlich freigesetzter Inhibitor oder "künstlicher" Inhibitor bezeichnet (47).

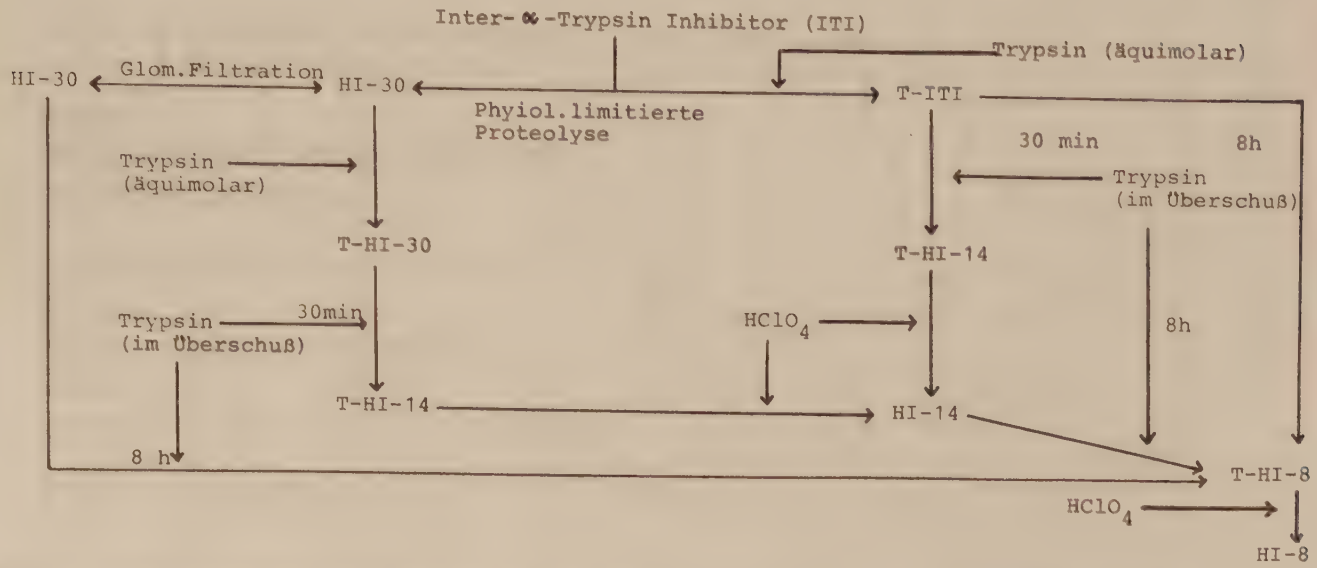
Wie schon angedeutet (s.S. 15), konnten HOCHSTRASSER et al. zeigen, daß das antitryptisch aktive Zentrum des ITI von einer Aminosäurensequenzreihe gebildet wird, die den bekannten Kunitz-type Inhibitoren homolog ist. Diese Domain, das auch als Minimalinhibitor bezeichnet wird, wird durch Langzeitbehandlung mit Trypsin über einen Trypsin-Inhibitorkomplex aus nativem ITI oder aus dem physiologischen HI-30 freigesetzt.
Als Zwischenstufe wurde jedoch ein Inhibitor gefunden, der ein etwa doppelt so hohes Molekulargewicht hat wie dieser Minimalinhibitor. Der HI-14 ist fähig mit Trypsin Komplexe im Verhältnis 1:1 zu bilden, die dem Minimalinhibitor HI-8 ähnlich sind.

Nach der Bestimmung der Aminosäurensequenz des HI-14 konnten HOCHSTRASSER et al. zeigen, daß der HI-14 aus zwei Kunitz-type Domains zusammengesetzt ist. Beide Domains sind einander homolog und ebenfalls homolog den bekannten Kunitz-type Inhibitoren (46).

Wie aus Abb.2, S. 22 ersichtlich, ist die Aminosäurensequenz, die den reaktiven Bereich des inhibitorisch aktiven Domains (= HI-8) umgibt, dem BPTI äußerst homolog.

Das zweite Domain, aus dem der HI-14 noch besteht, zeigt keine inhibitorische Aktivität. In Anlehnung an LASKOWSKY jun. (54) könnte man dieses "inaktive" Domain des HI-14 als mögliches reaktives Zentrum für bisher noch unbekannte Proteasen ansehen.

Abb. 1 Verwandschaftsbeziehungen zwischen Inter-α-Trypsin Inhibitor und seinen physiologischen und künstlichen Derivat-Inhibitoren (nach HOCHSTRASSER)



HI-30 = Physiologischer Inhibitor, MG = 30 000
HI-14 = mit Trypsin freigesetzter Inhibitor, MG = 14 000
HI-8 = mit Trypsin freigesetzter Inhibitor, MG = 8 000

T-ITI = Trypsinkomplex
T-HI-30 = Trypsinkomplex
T-HI-14 = Trypsinkomplex
T-HI-8 = Trypsinkomplex

Abb. 2: Vergleich der Aminosäurensequenzen, die die aktiven Zentren der 2 Domains des HI-14 umgeben mit den Aminosäurensequenzen, die die aktiven Zentren von Kunitz- und Kazak-type Inhibitoren umgeben (nach HOCHSTRASSER, 46).

Kunitz-type Inhibitoren	P_4	P_3	P_2	P_1	P'_1 *)
BPTI (bovine basic pancreatic trypsininhibitor)	Gly	Pro	Cys	Lys	Ala
HI-14 antitryptisch aktives Domain (= HI-8)	Gly	Pro	Cys	Arg	Ala
HI-14 antitryptisch inaktives Domain	Gly	Pro	Cys	Met	Gly
Kazal-type Inhibitoren					
Inhibitor aus Gl. submandibularis des Hundes					
Domain I antitryptische Aktivität	Ala	Cys	Pro	Arg	leu
Domain II antichymotryptische Aktivität	Met	Cys	Pro	Met	Asp
Ovomukoid des Truthahnes					
Domain III antichymotryptische Aktivität	Ala	Cys	Thr	Leu	Glu

*) $-P_1 - P'_1$ kennzeichnet die Aminosäurensequenz am aktiven Zentrum

II. 2.3. Der künstliche Inhibitor HI-8

Im Verlaufe der Auftrennung des physiologischen Inhibitors HI-30 mit an Sepharose gebundenem Trypsin bei der Affinitätschromatographie, wird der HI-30 teilweise in HI-14 umgewandelt. Bei der nachfolgenden Gelelektrophorese dieses Eluats fanden HOCHSTRASSER et al. in einem Bereich, der Proteinen mit einem Molekulargewicht von 8 000 entspricht, antitryptische Aktivität.

Das entsprechende Auftrennungsmuster erhielten sie, als sie Material nahmen, das durch Langzeitinkubation des ITI, oder des HI-30 oder des HI-14 gespalten worden war.
Damit konnten sie beweisen, daß der neue Inhibitor mit einem app. Molekulargewicht von 8 000 ein Derivat des ITI sein muß.
Erschwerend bei dieser Nachforschung war zu Anfang die Tatsache, daß der HI-8 keine immunologische Kreuzreaktion mit ITI-Antikörpern zeigte.
Nach Bestimmung der Aminosäurensequenz des HI-8 (48) konnte gezeigt werden, daß sie eine ausgeprägte Homologie zu bekannten Kunitz-type Inhibitoren aufweist (s. Abb. 2). Damit stellte sich die vermutete Eigenschaft des HI-8 als Träger der inhibitorisch aktiven Aminosäurensequenz des ITI als richtig heraus (48, 49). Die Bezeichnung des HI-8 als Minimalinhibitor ist demnach korrekt.

Aus den bisher bekannten Daten über den Inter-alpha-Trypsininhibitor und seinen Derivaten kann man zusammenfassend feststellen, daß man aus höhermolekularen Vorstufen durch Spaltung mit Proteasen (z.B. mit Trypsin) niedermolekulare Inhibitoren freisetzen kann.
Nach bisherigen Beobachtungen wurde der ITI mit Trypsin erschöpfend aufgespalten. Man erhielt die inhibitorisch aktiven Derivate HI-30, HI-14 und HI-8. Ihre Verwandtschaftsbeziehungen untereinander und zum ITI sind in Abb. 1, S. 21 dargestellt.

Ferner konnte bewiesen werden, daß der HI-8 die für die Inhibitoraktivität wichtige Aminosäuresequenz des ITI und der von ihm abgeleiteten physiologischen und künstlichen Abkömmlinge ent-enthält.

Nachdem mit Trypsin keine weiteren inhibitorisch aktiven Spaltprodukte des ITI mehr zu erhalten waren, stellte sich die Frage, ob man mit anderen Proteasen noch andere Inhibitoren aus dem ITI freisetzen könnte.

II. 3. Inhibitorfreisetzung aus Serum mit Thermolysin

Der Anlaß zur Durchführung der folgenden Untersuchungen waren folgende Beobachtungen von HOCHSTRASSER:
Durch Trypsinverdauung von nativem oder denaturiertem Serum kann die gesamte antitryptische Aktivität des ITI in Form des säurestabilen HI-14 freigesetzt werden. Werden die Verdauungsansätze enteiweißt, so findet sich diese Aktivität im Überstand. Aus den verbleibenden fällbaren Proteinen ist mit Trypsin keine inhibitorische Aktivität mehr freisetzbar. Wird das denaturierte Protein jedoch mit Thermolysin inkubiert, so kann erneut ein säurestabiler Inhibitor freigesetzt werden. Als Vorstufe für diesen Inhibitor mußte aufgrund der bisherigen Befunde ITI ausscheiden.
Es muß für den durch Thermolysin freigesetzten Inhibitor eine andere Vorstufe angenommen werden. Zur Identifizierung dieser Vorstufe mußten die Serumproteine weitgehend aufgetrennt werden, um die einzelnen Inhibitoren, bzw. deren Vorstufen voneinander abzugrenzen. Für Vorversuche wurde zunächst Rinderserum der Austauschchromatographie an DEAE-Sephacel unterworfen.

II. 3.1. Fraktionierung des Rinderserums

Zur Anreicherung der vermuteten Vorstufe des mit Thermolysin freigesetzten Inhibitors wird im Modellversuch das vorbereitete Rinderserum durch Anionenaustauschchromatographie mit DEAE-Sephacel-Gel fraktioniert. Die Trennung der Serumproteine geschieht hierbei durch Wechselwirkung der Aminosäuren der mobilen Phase (hier das Rinderserum) mit ionisierten Gruppen der stationären Phase (hier die Phosphat-Ionen des vorbereiteten DEAE-Sepha-

cel-Gels). Man bevorzugt Ionenaustauscher auf Cellulosebasis (hier DEAE: Diäthylaminoäthylreste) für die Proteintrennung, da die sonst üblichen Kunstharze Proteine zu stark binden und dadurch die Konformation zerstört werden kann (2).

Das DEAE-Sephacel-Gel wurde mit TRIS-Startpuffer, eingestellt auf pH 8,6, so lange durchgewaschen, bis das unten aus der Chromatographiesäule auslaufende Eluat ebenfalls einen pH von 8,6 erreicht hatte. Das gegen TRIS-Puffer dialysierte Rinderserum wurde dann auf die Säule gepumpt. Das alkalische Rinderserum, bei dem die Aminosäuren als Anionen vorliegen, durchströmt die Chromatographiesäule. Aus der Elektrolytlösung Rinderserum werden nun Anionen im Austausch gegen eigene Anionen des DEAE-Sephacel-Gels aufgenommen. Mit Hilfe eines Gradientenmixers wird die Chromatographiesäule dann während der gesamten Laufzeit des Fraktionsteilers mit einem Puffer von fallendem pH-Wert durchspült. Durch die pH-bedingte Milieuänderung nehmen die Aminosäuren Zwitterionengestalt an. In dieser Form werden sie nicht mehr so stark an die stationäre Phase gebunden und wieder gegen Anionen der mobilen Phase eingetauscht. Da sich die pH-Werte der einzelnen Aminosäuren unterscheiden, nehmen sie bei unterschiedlichem pH ihre Zwitterionenform an und erscheinen zu verschiedenen Zeiten im Eluat (2).
Im vorliegenden Versuch wurde der alkalische Anfangspuffer TRIS mit pH-Wert von 8,6 durch den Gradientenmixer allmählich gegen den sauren Endpuffer TRIS-Phosphatpuffer mit pH-Wert von 3,75 ersetzt.
Das Eluat wird von dem automatisch laufenden Fraktionsteiler in Reagenzgläser zu jeweils 20 ml Inhalt aufgeteilt.

Die Lokalisation der einzelnen Inhibitoren bzw. deren Vorstufen im Eluat erfolgte folgendermaßen:

II. 3.2. Säurelabile Inhibitoren

Zur Lokalisation der bekannten Seruminhibitoren werden in aliquoten Teilen der Fraktionen die jeweilige Hemmung gegen Trypsin untersucht (Abb. 4, Seite 30). Es finden sich ein Bereich mit

hoher Aktivität in der Mitte des Elutionsdiagrammes, die von α_1-Antitrypsin, dem Hauptinhibitor des Serums, ausgeht. Die am Ende des Diagrammes gefundene Aktivität geht mit Sicherheit von einem dem menschlichen ITI homologen Protein aus, da in Chormatographieläufen mit Humanserum in diesem Bereich mit immunologischen Verfahren ITI nachgewiesen werden kann.

II. 3.3. Säurestabiler Inhibitor

Um den säurestabilen, physiologischen Inhibitor HI-30 lokalisieren zu können, werden aliquote Teile einzelner Fraktionen mit $HClO_4$ (3 %ig) versetzt, um die säureinstabilen Proteine auszufällen. Nach zehnminütiger Inkubation wurde zentrifugiert. Damit werden alle Seruminhibitoren und auch ITI, säurestabile ITI-Spaltprodukte, Enzyme und Inhibitorvorstufen präzipitiert. Die Überstände werden mit K OH neutralisiert und zum Trypsinhemmtest eingesetzt. Aus Abb. 4 und Abb. 5 ist die Lokalisierung des HI-30 im Elutionsdiagramm ersichtlich.

II. 3.4. Lokalisierung des Inter-alpha-Trypsininhibitors

Wie aus den Arbeiten von HOCHSTRASSER (46, 47, 48, 49) hervorgeht, ist der ITI auch denaturiert leicht zu charakterisieren. Die inhibitorisch aktive Amionsäurensequenz kann durch Trypsin in Form des säurestabilen Inhibitors HI-14 freigesetzt werden. Diese Tatsache erlaubt im Elutionsdiagramm den ITI zu lokalisieren. Dazu werden aliquote Mengen der unter II. 3.3. gewonnenen Niederschläge mit TRA-Puffer und aqua dest. aufgelöst und mit NaOH auf pH 8 gebracht. Diese Lösung wird dann mit Trypsin im Überschuß 1 Stunde lang bei 37° C im Wasserbad inkubiert. Um den HI-14 aus dem mit Trypsin gebildeten Komplex freizusetzen, wird anschließend mit 3 %ig $HClO_4$ 15 Minuten lang inkubiert und danach zentrifugiert. Der Überstand wird zum Trypsinhemmtest herangezogen. Die gemessene Inhibitoraktivität, die ITI entspricht, wird in Abb. 4 und 5 graphisch dargestellt. Die nach der Trypsinbehandlung erneut anfallenden Niederschläge werden mit TRA-Puffer und aqua dest. aufgelöst, mit 5 N NaOH auf etwa pH 8 gebracht und zur Lokalisation des durch Thermolysin freilegbaren Inhibi-

tors verwendet.

II. 3.5. Lokalisation des mit Thermolysin freilegbaren Inhibitors

Zur vorbereiteten Lösung (siehe II.3.4.) wird 0,2 ml Thermolysinlösung (2 mg Thermolysin in 1 ml TRA-Puffer, pipetiert und bei 37° C 2 Stunden lang inkubiert. Um den freigesetzten Inhibitor nachzuweisen, wird eine Proteinfällung mit 3 %iger $HClO_4$ durchgeführt. Nach Zentrifugation befindet sich der gesuchte Inhibitor im Überstand und kann mit dem Trypsinhemmtest nachgewiesen werden (Abb. 4).
Die Ergebnisse belegen bereits, daß der durch Thermolysin freilegbare Inhibitor offenbar nichts mit dem ITI zu tun hat, da sich die Vorstufe an einer völlig anderen Stelle des Elutionsdiagrammes befindet als der ITI.

II. 3.6. Gelfiltration der gesuchten neuen Vorstufe des Inhibitors

Das gefriergetrocknete Material wird in Boratpuffer (0,5 M Borat und 0,1 N NaCl mit einem pH von 8) aufgelöst und zur weiteren Auftrennung auf einem Molekularsieb (Sephadex G 200) fraktioniert. Aufgelöst werden 4,6 g der lyophilisierten Probe in 50 ml Boratpuffer.
Im Elutionsdiagramm wird die gesuchte Vorstufe wieder nach Freilegung mit Thermolysin lokalisiert. Zuerst werden wieder aliquote Mengen des Eluats durch Zugabe von 3 %iger $HClO_4$ deproteinisiert und anschließend zentrifugiert. Der Niederschlag wird wie zuvor mit aqua dest. und TRA-Puffer aufgelöst und mit 5N NaOH neutralisiert. Nach Zugabe von 0,05 ml Thermolysinlösung wird im Wasserbad 90 Minuten lang bei 37° C inkubiert. Es wird dann wieder mit $HClO_4$ gefällt und Zentrifugiert. Der Überstand wird neutralisiert und die freigesetzte Inhibitoraktivität mit dem Trypsinhemmtest bestimmt (Abb. 6 Seite 32).

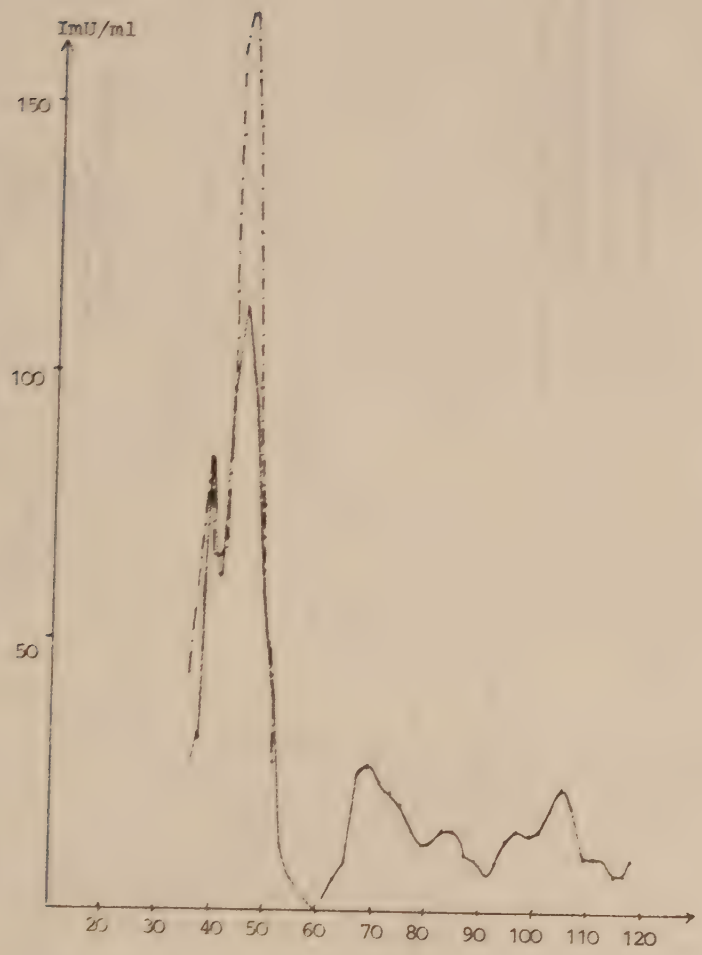
Das vereinigte Material wird zur Verkleinerung des Gesamt-Volumens mit Ammoniumsulfat auf 62 % Sättigung gebracht und zentrifugiert. Der Niederschlag wurde dann gegen Wasser dialysiert und lyophilisiert.

III. E R G E B N I S

Im Elutionsdiagramm der Anionenaustauschchromatographie von Rinderserum wurde mittels des Trypsinhemmtestes (siehe Seite 33) die verschiedenen Inhibitoren bzw. Inhibitorvorstufen lokalisiert. In der Abb. 3, Seite 29 ist die Verteilung der Inhibitoraktivitäten des nativen Rinderserums innerhalb der chromatographischen Auftrennung graphisch dargestellt.
Der physiologische, säurestabile HI-30 findet sich dagegen im Überstand der enteiweißten Fraktionen, wodurch die Abgrenzung von den übrigen Seruminhibitoren möglich ist. Nach Trypsininkubation gelingt es, auch ITI zu lokalisieren. ITI, charakterisiert durch Umwandlung in HI-14 (Trypsininkubation) und HI-30, befindet sich im nahen oder gleichen Bereich des Serums (Abb. 4). Die mit Thermolysin freigesetzte inhibitorische Aktivität tritt im Gegensatz dazu an einer ganz anderen Stelle des Elutionsdiagrammes auf.
Zur weiteren Anreicherung der Vorstufe des Inhibitors wurde das entsprechende Material auf dem Molekularsieb Sephadex G 200 weiter aufgetrennt. Danach konnte keine weitergehende Auftrennung mehr erreicht werden. Das Material, das durch Thermolysin freilegbare inhibitorische Aktivität enthält, zeigt bei der Gelchromatographie ein Molekulargewicht von etwa 100 000.

Bei analogen Untersuchungen mit Humanserum, kam HOCHSTRASSER zu dem Resultat, daß es sich bei dem Material, das durch Thermolysin freilegbare inhibitorische Aktivität enthält, um Immunglobulin G handelt. Offenbar handelt es sich um einen Komplex aus dem Immunglobulin G und dem Inhibitor. Das Immunglobulin G wird durch die Protease Thermolysin soweit gespalten, daß seine Fähigkeit, Inhibitoren zu binden, verloren geht. Allem Anschein nach handelt es sich dabei um einen Autoimmunkomplex (körpereigener Inhibitor als Antigen und Immunglobulin G asl Antikörper).

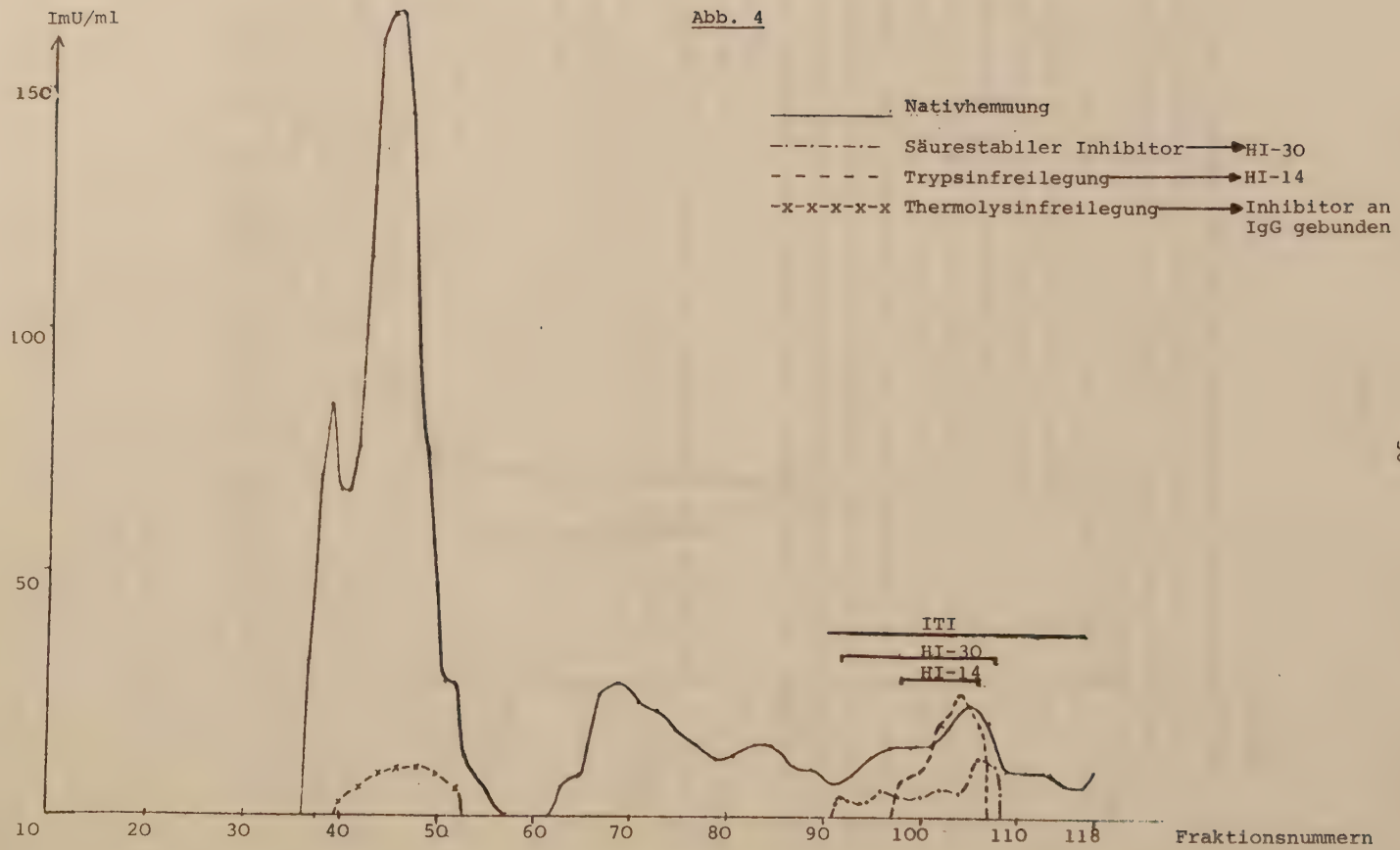
Abb. 3



——— zu Tab. 1

- - -·- zu Tab. 2

Abb. 4


ImU/ml
150
100
50
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
118
Fraktionsnummern
Nativhemmung
Säurestabiler Inhibitor → HI-30
Trypsinfreilegung → HI-14
Thermolysinfreilegung → Inhibitor an IgG gebunden
ITI
HI-30
HI-14

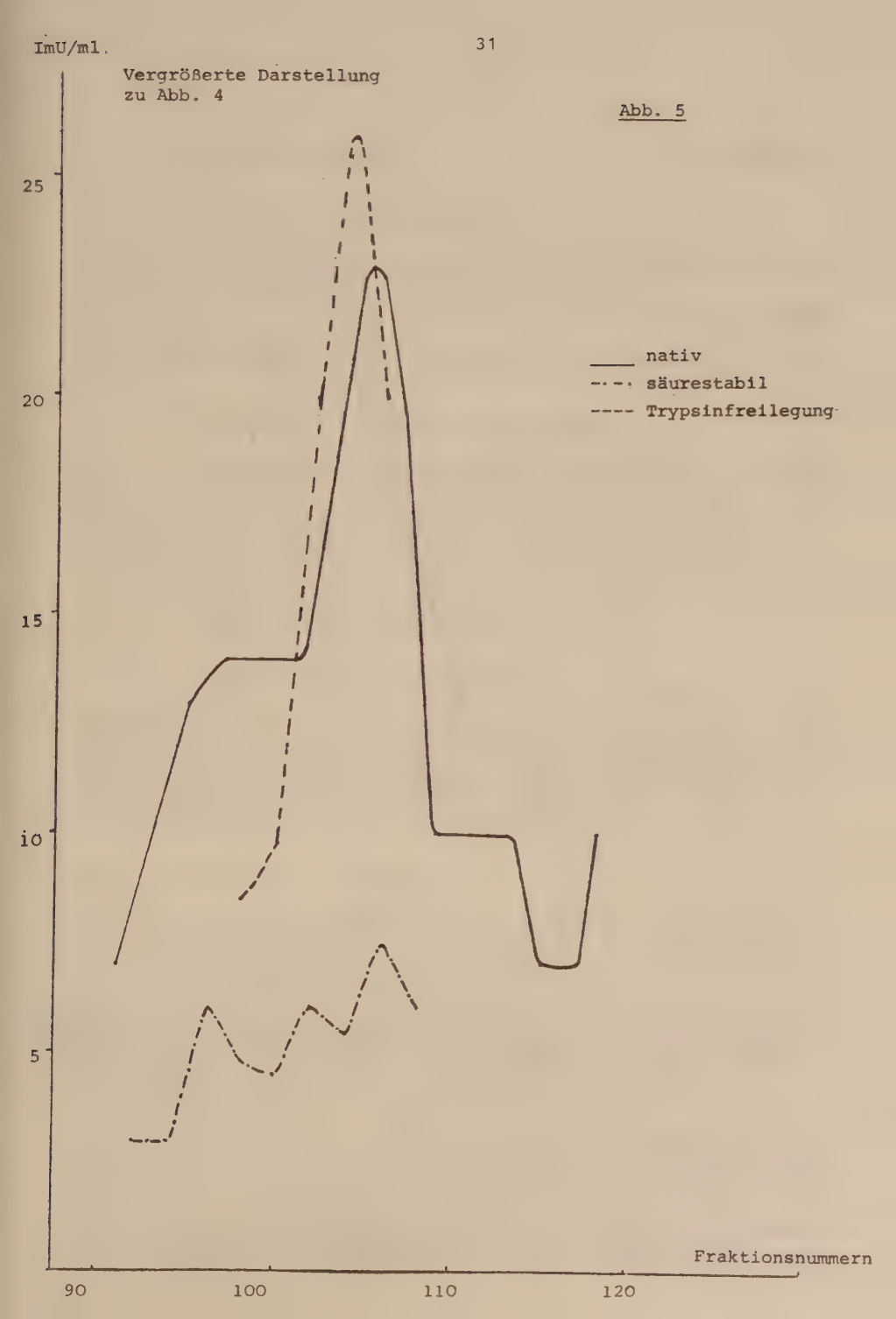
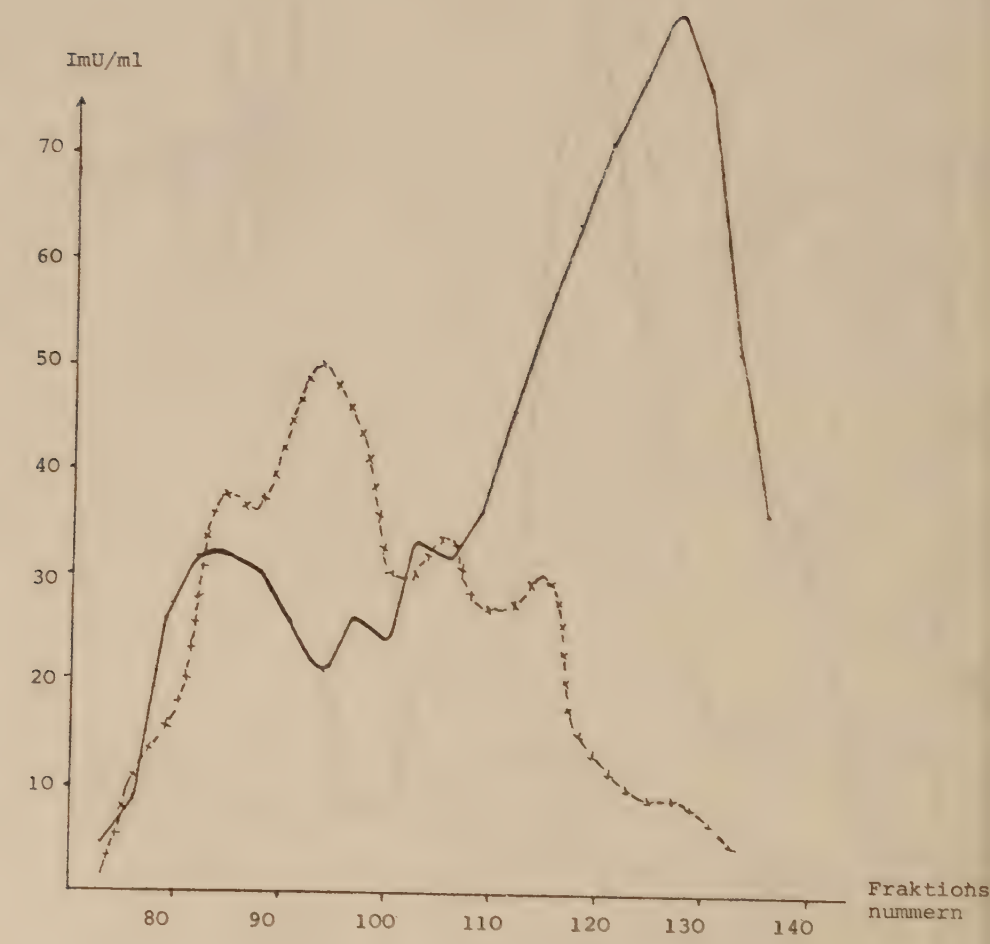

ImU/ml.
Vergrößerte Darstellung
zu Abb. 4
Abb. 5
25
20
15
10
5
nativ
säurestabil
Trypsinfreilegung
Fraktionsnummern
90
100
110
120

Abb. 6



____ Nativhemmung
-x-x nach Thermolysininkubation

zu Tabelle 6 und 7

IV. EXPERIMENTELLER TEIL

IV. 1. Vorbereitung des Rinderserums

Das Serum wird 1 Tag lang gegen den Startpuffer TRIS dialysiert, anschließend Zentrifugation und Filterung.

Material:
0,04 M TRIS-Puffer (Trishydroxymethyl-aminomethan), pH 8,6

IV. 2. Vorbereitung der Chromatographiesäule

Die im DEAE-Sephacel-Gel enthaltenen Chlorid-Ionen müssen für unsere Zwecke gegen Phosphat-Ionen ausgetauscht werden. Dies geschieht durch langsames Auswaschen der Originalmasse mit 1 M Dinatriumhydrogenphosphat · 2 H_2O. Danach wird das Sephacel-Gel in die Chromatographiesäule eingebracht. Die Säule wird mit dem vorbereiteten Startpuffer äquilibriert.

IV. 3. Vorbereitung des Endpuffers

Der Endpuffer ist ein saurer TRIS-Phosphatpuffer aus 0,5 M TRIS und 0,5 M Phosphorsäure von 85 % mit einem pH-Wert von 3,75. Für 5 Liter Endpuffer werden 169 ml Phosphorsäure mit 302,85 g TRIS gemischt und mit aqua dest. auf 5 Liter Volumen aufgefüllt.

IV. 4. Der Trypsin - Hemmtest

Für die Hemmwertbestimmung ist zunächst der Vergleichswert notwendig. In eine Glasküvette werden 0,2 ml Trypsinlösung gegeben, die mit TRA-Puffer (Triäthanolhydrochlorit) auf 2,0 ml aufgefüllt werden. Die Spaltungsreaktion wird durch Zugabe von 1,0 ml BAPA gestartet. Die gemessene Extinktionsänderung Δ E pro Zeiteinheit (hier alle 60 sek.) bildet den Vergleichswert.
Das proteolytische Enzym Trypsin setzt aus dem Substrat BAPA (N-Benzoyl-L-arginin-4-nitroanilid-Hydrochlorid) den Farbstoff p-Nitroanilid frei. Im Photometer läßt sich die Spaltungsreaktion direkt als Extinktionszunahme bei einer Wellenlänge von 405 nm verfolgen. Da die Trypsinkonzentration für die Geschwindigkeit der Reaktion bestimmend ist, gilt das Lambert-Beer'sche

Gesetz wie folgt:

$$E = \lambda \cdot c$$

E: Extinktionsänderung pro Zeiteinheit

λ: Absorptionskoeffizeint für BAPA

c: Konzentration des Trypsins

Für den Trypsin-Hemmtest werden nun nacheinander in eine Glasküvette gefüllt:

0,2 ml Trypsinlösung
1,8 ml (minus ml der eingesetzten, inhibitorhaltigen Probe)
TRA
ml inhibitorhaltige Probe
1,0 ml BAPA

3,0 ml Küvetteninhalt

Versuchsbedingungen: 25 C
Filter 405 nm

Die Reaktion wird nach einer Inkubationszeit von 1 - 2 Minuten durch Zugabe des BAPA gestartet. Alle 60 Sekunden wird die Extinktion abgelesen, die jeweilige Differenz der Extinktion berechnet und aus den Werten das arithmetische Mittel gebildet.

Berechnung der Aktivität:

$$\frac{E_{Leerwert} \text{ minus } E_{Probe}}{6,6} \text{ mal eingesetzte Menge der Probe, auf 1,0 ml hochgerechnet} = \text{ImU / ml}$$

ImU = internationale milli-Units

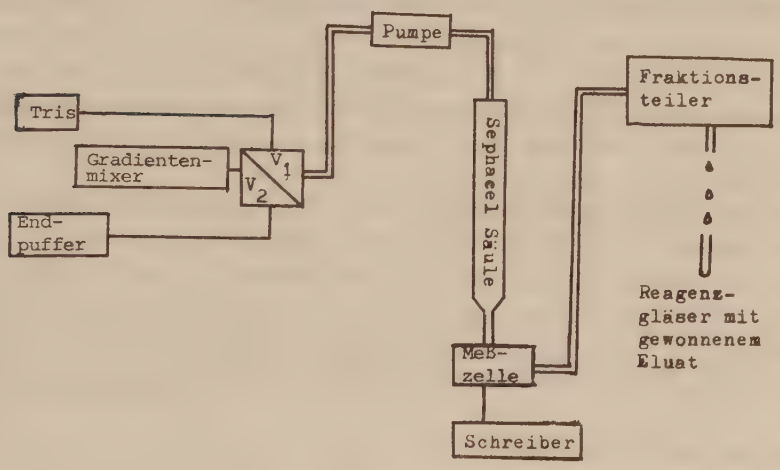
1 Unit = Umsatz von 1 Mol Substrat pro Minute unter Standardbedingungen

IV. 5. Versuchsdurchführung

Die Auftrennung der Plasmaproteine wird auf dem vorbereiteten Anionenaustauscher durchgeführt.
Mittels eines Gradientenmixers wird während der gesamten Lauf-

zeit des Fraktionsteilers der alkalische Anfangspuffer TRIS, pH 8,6, nach einem bestimmten Gradienten immer mehr von dem sauren Endpuffer, pH 3,75 ersetzt. Die einzelnen Fraktionen des Plasmas werden daher mit fallendem pH der Pufferzusammensetzung gemäß ihrem isoelektrischen Punkt eluiert.

Versuchsanordnung:



Das gewonnene Eluat wird dem Trypsin-Hemmtest unterzogen, um die Inhibitoraktivität zu ermitteln.
Siehe Tabelle 1 und Tabelle 2.
Siehe graphische Darstellung zu Tabelle 1 und Tabelle 2 in Abb. 3, Seite 29.

Im Bereich der Fraktionsnummern 37 - 51 zeigt sich eine Inhibitoraktivität.
Eine weitere, wenn auch schwächere Aktivität ist im Bereich der

Fraktionsnummern 67 - 80 und 101 - 109 zu registrieren (Abb. 1)

Säureinkubation: zur HI-30 Lokalisation

Die einzelnen Fraktionen werden mit 3 %iger Perchlorsäure versetzt, um die säureinstabilen Proteine zu eliminieren. Dazu werden 16 ml jeder Fraktion in neue Reagenzgläser pipettiert und mit 1,6 ml Perchlorsäure versetzt. Nach 10 minütiger Inkubation wird zentrifugiert.
Je 5 ml des Überstandes werden mit Kaliumhydroxit neutralisiert und dem Trypsin-Hemmtest unterzogen. Man kann sich jetzt den säurestabilen HI-30 darstellen, siehe Tabelle 3 und Abb. 4 + 5.

Trypsininkubation zur ITI-Lokalisation als HI-14

Der Niederschlag aus dem oben zentrifugierten Material wird mit Trypsin aktiviert und mit 3 %iger Perchlorsäure versetzt, um den HI-14 freizusetzen. Abb. 4 + 5
In jedes Reagenzglas werden 0,2 ml Trypsin zupipettiert, anschließend wird 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Um den HI-14 aus dem mit Trypsin gebildeten Komplex freizusetzen, wird 15 Minuten lang mit 3 %iger Perchlorsäure inkubiert und anschließend zentrifugiert. Mit dem erhaltenen Überstand wird nach Neutralisation mit K OH der Trypsin-Hemmtest durchgeführt. Tabelle 4, Abb. 4 + 5

Thermolysininkubierung:

Der Niederschlag aus obiger Zentrifugation wird mit TRA-Puffer und Aqua dest. aufgelöst, mit 5 N NaOH auf pH 8 gebracht und mit Thermolysin 2 Stunden lang bei 37°C inkubiert.
2 mg Thermolysin werden in 1 ml TRA-Puffer gelöst. Von dieser Lösung werden 0,2 ml zum vorbereiteten Niederschlag pipettiert. Nach der Inkubation wird wieder mit 3 %iger Perchlorsäure der Inhibitor aus seinem Trypsinkomplex freigesetzt. Nach Zentrifugation befindet sich der gesuchte Inhibitor im Überstand, wie der Trypsin-Hemmtest nach vorheriger Neutralisation ergab. Tabelle 5 und Abb. 4

Zur Materialgewinnung wurden die Fraktionsnummern 40 - 53 gesammelt, gegen Aqua dest. dialysiert und gefriergetrocknet.

Gelfiltration auf Sephadex G 200

4,6 g der gefriergetrockneten Probe wurden in 50 ml Boratpuffer (0,05 M Borat und 0,1 N NaCl, pH 8) aufgelöst und zur weiteren Reinigung auf ein Molekularsieb (Sephadex G 200) aufgebracht. Tabelle 6 und Abb. 6
Um den gesuchten Inhibitor darzustellen, wird wieder mit Thermolysin inkubiert:
Versetzen mit 3 %iger Perchlorsäure, Zentrifugation.
Niederschlag wird mit 0,5 ml TRA-Puffer und mit 1,0 ml Aqua dest. aufgelöst, mit 5 N NaOH neutralisiert und nach Zugabe von 0,05 ml Thermolysinlösung im Wasserbad bei 37°C 90 Minuten lang inkubiert. Nach weiterer Zugabe von 150 ml Perchlorsäure wird wieder zentrifugiert. (Tabelle 6 und Abb. 6)
Der gewonnene Überstand wird mit 5 N NaOH neutralisiert und dem Trypsin-Hemmtest unterzogen. Tabelle 7 und Abb. 6

Aus Tabelle 7 ist zu entnehmen, daß im Bereich der Fraktionsnummern 83 bis 110 eine freilegbare Inhibitoraktivität auftritt, d.h., daß Trypsin hier gehemmt wird. Abb. 6

Das Eluat aus den Fraktionsnummern 83 - 110 wird vereinigt und zur Verkleinerung des Gesamtvolumens mit Ammoniumsulfat auf 62 % Sättigung gebracht.

76 g Ammoniumsulfat / 1000 = 100 %
47 g Ammoniumsulfat = 62 %

47 g Ammoniumsulfat werden dem Eluat auf der Rührmaschine langsam zugesetzt. Anschließend wird zentrifugiert.
Der Überstand wird gegen Wasser dialysiert und gefriergetrocknet.
Der Niederschlag wird mit Wasser aufgelöst, gegen Wasser dialysiert und ebenfalls gefriergetrocknet.

Tabelle 1

Trypsin-Hemmtest mit fraktioniertem Rinderserum, das auf der DEAE-Säule gewonnen wurde:

1. Werte der Nativhemmung, eingesetzte Probenmenge: 0,100 ml
   Auf die Säule wurden 75 ml Serum gepumpt.

Fraktion Nr.	Leerw.	21	23	25	27	29	31	33
Extinktions-	70	78	81	89	135	136	100	114
werte	135	145	150	160	204	204	172	183
	202	212	219	229	269	272	243	259
ΔE	67	67	69	70	67	68	71	69
ImU/ml	0	0	0	0	0	0	0	0

Fr.Nr.	35	37	39	41	43	45	47	49	51
Ext.	120	111	71	91	50	33	42	81	125
	189	160	85	120	55	34	50	122	168
	258	207	99	148	60	34	55	152	210
ΔE	69	48	14	28	5	0	7	30	43
ImU/ml	0	31,8	83,3	62,1	96,9	100	93,9	59	39,3

Fr.Nr.	53	55	57	59	61	63	65	67	69
Ext.	174	100	104	115	119	140	150	100	91
	234	165	173	184	186	205	214	154	145
	295	230	249	252	253	270	275	207	195
ΔE	61	65	68	69	67	65	63	53	52
ImU/ml	12,6	6	0	0	0	6	9	25	27

Fr.Nr.	71	73	75	77	79	81	83	85	87
Ext.	90	105	129	145	100	103	105	114	135
	145	160	189	205	161	164	165	175	198
	198	215	246	264	224	224	225	235	260
ΔE	54	55	58	60	62	61	60	60	63
ImU/ml	24	22	18	15	12	13	15	15	10

Fortsetzung Tabelle 1

Fr.Nr.	89	91	93	95	97	99	101	103	105
Ext.	150	100	103	104	109	125	144	100	107
	214	165	167	165	170	185	205	158	164
	275	230	230	225	230	246	265	215	218
ΔE	63	65	64	61	60	60	60	57	55
ImU/ml	10	7	9	13	15	15	15	19	23

Fr.Nr.	107	109	111	113	115	117	118
Ext.	111	129	143	158	100	110	110
	169	190	207	220	165	175	172
	226	254	270	285	230	240	235
ΔE	57	63	63	63	65	65	63
ImU/ml	19,6	10	10	10	7	7	10

Tabelle 2

Wiederholung des Testes mit 0,050 ml Probe

Fr.Nr.	38	39	40	41	42	43	44	45	46
Ext.	100	109	114	115	126	125	80	86	86
	148	153	164	163	173	159	99	104	104
	194	192	210	210	216	190	114	115	118
ΔE	47	42	48	48	45	32	17	15	15
ImU/ml	69,6	84,8	66,6	66,6	75,7	115	160,6	166,6	166,6

Fr.Nr.	47	48	49	50	52
Ext.	94	119	136	101	109
	119	156	181	142	164
	139	194	225	180	215
ΔE	22	38	45	39	52
ImU/ml	145,4	96,9	75,7	46,9	27,2

Tabelle 3

Nach der Proteinfällung mit Perchlorsäure, Neutralisieren und dem Zentrifugieren wurde mit dem Überstand wieder ein Trypsin-Hemmtest gemacht. Es wurden dabei als Probenmenge 0,0500 ml eingesetzt.

Fr.Nr.	Leerw.	22	24	26	28	30	32	34	36
Ext.	100	131	131	151	160	265	100	110	-
	158	195	195	224	225	225	163	173	-
	215	264	259	295	290	289	225	235	-
ΔE	58	67	64	70	65	63	63	63	-
ImU/ml	0	0	0	0	0	0	0	0	-

Fr.Nr.	38	40	42	44	46	48	50	52	54
Ext.	129	120	149	179	60	59	67	77	93
	190	179	210	234	122	121	126	138	154
	248	236	270	291	182	182	188	198	215
ΔE	60	58	60	59	61	61	60	60	61
ImU/ml	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Fr.Nr.	56	58	60	62	64	66	68	70	72
Ext.	60	63	70	75	94	-	105	60	64
	122	125	134	135	158	-	165	120	125
	184	188	195	198	216	-	224	182	186
ΔE	62	62	62	61	60	-	60	61	61
ImU/ml	0	0	0	0	0	-	0	0	0

Fr.Nr.	74	76	78	80	82	84	86	88	90
Ext.	74	77	93	108	60	65	78	82	96
	136	140	155	171	122	129	145	143	157
	199	202	214	232	-	-	-	-	-
ΔE	62	62	60	62	62	64	67	61	61
ImU/ml	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Fortsetzung Tabelle 3

Fr.Nr.	92	94	96	98	100	102	104	106	108
Ext.	100 154 205	116 170 222	81 125 168	99 147 194	109 157 205	89 134 177	100 147 190	120 160 196	122 161 208
ΔE	53	53	43	47	48	43	45	38	43
ImU/ml	3	3	6	4,8	4,5	6	5,4	7,4	6

Fr.Nr.	110	112	114	Leerwert
Ext.	146 207 269	159 220 281	150 212 275	60 125 191
ΔE	61	61	62	65
ImU/ml	0	0	0	0

Fraktion - I: Nr. 92, 94, 96 98 = BU I

Fraktion - II: Nr. 100, 102, 104, 106, 108 = BU II

Die beiden Fraktionen vereinigen, neutralisieren, einengen und testen mit Kallikrein und Trypsin.

Tabelle 4

Trypsinaktivierung des Niederschlages - Probenmenge eingesetzt 0,2 ml

Fr.Nr.	LW	22	24	26	28	30	32	34	36
Ex-	100	189	134	134	185	164	100	103	110
tink-	164	253	190	194	248	225	166	160	170
tion	225	314	248	254	309	285	230	218	229
ΔE	63	63	58	60	62	61	65	58	60
ImU/ml	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Fr.Nr.	38	40	42	44	46	48	50	52	54	56
Ext.	116	134	134	100	108	108	115	134	145	100
	175	194	190	160	168	166	174	192	203	160
	233	253	245	216	225	224	230	249	261	220
ΔE	59	60	55	58	59	58	58	58	58	60
ImU/ml	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Fr.Nr.	58	60	62	64	66	68	70	72	74	76
Ext.	115	118	124	140	155	65	62	65	72	88
	178	180	185	199	215	126	125	130	135	152
	238	240	245	260	278	188	185	190	197	214
ΔE	62	61	61	60	62	62	61	62	62	62
ImU/ml	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Fr.Nr.	78	80	82	84	86	88	90	92	94	96
Ext.	107	60	32	34	35	50	69	50	65	65
	171	124	93	95	98	107	126	107	130	129
	234	190	155	156	160	167	186	168	192	190
ΔE	63	64	62	61	62	58	59	59	63	62
ImU/ml	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Fortsetzung Tabelle 4:

Fr.Nr.	98	102	104	106	108	110	112
Ext.	63	56	50	102	60	64	90
	122	96	80	139	118	128	154
	180	131	108	175	178	190	214
ΔE	53	37	29	36	59	62	61
ImU/ml	7,5	20	26	20	0	0	0

Fr.Nr.	100
Ext.	72
	122
	172
ΔE	50
ImU/ml	9,8

Tabelle 5

Thermolysinaktivierung - als Probe eingesetzt 0,4 ml

Fraktions-Nr.	LW	22	24	26	28	30	32	34	36	38	40
Ext.	50 110 170	80 140 200	150 210 270	115 178 240	154 218 284	143 205 269	100 160 224	115 170 230	130 190 250	140 203 265	154 210 270
ΔE	60	60	60	62	65	63	62	60	60	62	58
ImU/ml	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3

Fr.Nr.	42	44	46	48	50	52	54	56	58	60	62
Ext.	148 204 259	100 154 205 255	115 163 214 265	118 165 214 265	118 165 218 268	144 200 255 310	165 224 285 345	100 165 225 286	96 163 225 287	95 162 224 290	92 157 222 288
ΔE	55	51	50	49	50	55	60	63	63	63	65
ImU/ml	5,3	8,3	9	9,8	9	5,3	-	-	-	-	-

Fr.Nr.	64	66	68	70	72	74	76	78	80	82	84
Ext.	118 181 247	104 170 235	100 165 225	113 175 240	116 180 244	115 179 241	120 182 245	110 173 236	100 162 223	120 182 243	126 190 250
ΔE	65	65	63	63	63	64	63	63	61	62	62
ImU/ml	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Fr.Nr.	86	88	90	92	94	96	98	100	102	104	106
Ext.	131 195 257	132 196 256	120 172 234	100 159 218	100 160 220	86 145 205	108 170 229	112 173 235	86 145 205	50 109 170	107 170 236
ΔE	63	61	58	60	60	60	60	61	60	60	64
ImU/ml	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabelle 6

Nativhemmung, 0,1 ml Probe eingesetzt auf Sephadex G 200

Fr.Nr.	LW	70	73	76	79	82	85	88	91	94
ΔE	60	59	57	54	43	39	39	40	43	46
ImU/ml	-	1,5	4,5	9	25,8	31,8	31,8	30	25,8	21

Fr.Nr.	97	100	103	106	109	112	115	118	121
ΔE	43	44	38	39	36	30	24	18	13
ImU/ml	25,8	24	33	31,8	36	45,5	54,5	63,6	71

Fr.Nr.	124	127	130	133	136
ΔE	9	5	10	26	36
ImU/ml	77	83	75,8	51	36

Tabelle 7 Thermolysininkubierung - 0,4 ml Probe eingesetzt

Fr.Nr.	LW	70	73	76	79	82	85	88	91	94	97
ΔE	60	57	59	53	50	44	35	36	31	29	30
ImU/ml		4,5	1,5	10,6	15	24	37,8	36	44	50	45,5

Fr.Nr.	100	103	106	109	112	115	118	121	124
ΔE	40	40	38	42	42	40	50	52	54
ImU/ml	30	30	33	27	27	30	15	12	9

Fr.Nr.	127	130	133
ΔE	54	55	58
ImU/ml	9	7,5	3

V. DISKUSSION

Im Laufe der Versuchsdurchführung zur Anreicherung der Vorstufe des vom Thermolysin abgespaltenen Inhibitors, ergab sich, daß eine weitere Reinigung nicht mehr zu erreichen war.
HOCHSTRASSER arbeitete mit dem gesammelten Material weiter und es gelang ihm der Nachweis, daß es sich dabei um reines Ig G (Immunglobulin G) handelt. Der zunächst als Abkömmling des ITI vermutete Inhibitor, der aber nach neuesten Ergebnissen nichts mit ITI zu tun hat, liegt nach diesem Ergebnis als ein an das Ig G gebundener Komplex im Serum vor. Der Definition nach handelt es sich dabei um einen Autoimmunkomplex, da Ig G als Antikörper ein körpereigenes Eiweiß (den Inhibitor) als Antigen erkennt und mit ihm reagiert. Normalerweise hat aber die Bildung von Autoimmunkomplexen im Organismus ernste Folgen: Als Beispiele bekannter Autoimmunkrankheiten seien hier angeführt: (2)

1. HASHIMOTO - Thyreoditis: Nachweis von Antikörpern gegen Thyreoglobulin

2. MORBUS ADDISON: Nachweis von Antikörpern gegen Mikrosomen der Nebennierenrindenzellen

3. Autoimmune hämolytische Anämie: Nachweis von Antikörpern gegen Erythrocytenantigene.

Bei der Bildung der Antigen-Antikörper-Komplexe kommt es auch gleichzeitig zur Aktivierung verschiedener proteolytischer Enzymsysteme, die diese Komplexe dann verdauen, im Falle der Autoimmunreaktion bedeutet das "Selbstverdauung".
Bisher hat es aber den Anschein, daß der Immunkomplex zwischen Ig G und dem Inhibitor physiologischerweise vorkommt und keine pathologischen Folgen nach sich zieht, wie das eigentlich zu erwarten wäre.

Dieser Tatsache wäre mit weiteren Untersuchungen Rechnung zu tragen: man muß klären, wie dieser Autoimmunkomplex zustande kommt und wie er aufgebaut ist.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Im Rinderserum, das als ein Modell für den beschriebenen Versuch verwendet wurde, ließ sich nach Fraktionierung auf einer Anionenaustauschchromatographiesäule und daran anschließender Inkubation mit Thermolysin eine Inhibitoraktivität nachweisen.
Auf der Suche nach der Vorstufe dieses Inhibitors, der zwar eine positive Kreuzreaktion mit Antiserum gegen ITI zeigt, aber wie neue Ergebnisse von HOCHSTRASSER belegen, offenbar nichts mit ITI zu tun hat, ergab sich, daß nach Auftrennung auf dem Molekularsieb keine weitere Reinigung mehr möglich war. Es zeigte sich vielmehr in weiteren Experimenten, daß dieser Inhibitor an das Immunglobulin G gebunden vorliegt.
Nach diesem Befund muß man einen Autoimmunkomplex zwischen Inhibitor und Immunglobulin G annehmen, der allen Anschein nach keine pathologischen Konsequenzen für den Organismus hat.

LITERATURVERZEICHNIS

1. KARLSON, P.: Kurzes Lehrbuch der Biochemie

2. HARPER, H.A., LÖFFLER, G., PETRIDES, P.E., WEISS, L.: Physiologische Chemie. Eine Einführung in die med. Biochemie für Studierende der Medizin und Ärzte (1975)

3. HUHNSTOCK, K., KUTSCHKA, W.: Diagnose und Therapie in der Praxis (1974)

4. FRITZ, H., TSCHESCHE, H., GREENE, L.J., TRUSCHEIT, E.: Proteinase Inhibitors - Bayer - Symposium V (1974)

5. BARETT, A.J., STARKEY, P.M.: Biochem. J. 133, 709 - 724 (1973)

6. STEINBRUCH, M., AUDRAN, R.: Biology and Pathology of Plasma Proteinase Inhibitors. Aus 4. s. oben: S. 78 - 95

7. JANOFF, A., ZELIOS, J.B.: Science 161, 702 - 704 (1968)

8. JANOFF, A., SCHERER, T.: J. exp. Med. 128, 1137 -1151 (1968)

9. HEIMBURGER, N., HAUPT, H., SCHWICK, H.G.: In: Fritz,H., Tschesche, H. (Eds.): Proceedings of the International Researche Conference on Proteinase Inhibitors, pp 1 - 21

10. SCHUSTER, R.: Dissertation 1974, Ludwig-Maximilian-Universität, München

11. FRITZ, H., HEIMBURGER, N., MEIER, M., ARNHOLD, M., ZANEVELD, L.J.D., SCHUMACHER, G.F.B.: Z. pyhsiol. Chem. 353, 1953 - 1956 (1972)

12. LAURELL, C.B., ERIKSSON, S.: Scand. J. Lab. Invest. 15

13. REICHERT, R., HOCHSTRASSER, K., HOCHGESAND, K.: Proteolyse und obstruktives Lungenemphysem. Münch. med. Wschr. 116, (1974) Nr. 4, 173 - 176

14. HOCHSTRASSER, K., FEUTH, H., HOCHGESAND, K.: Proteinase Inhibitors of the Respiratory Tract: Studies on the Structural Relationship between Acid-Stable Inhibitors Present in in the Respiratory Tract, Plasma and Urine. Aus 4. s.oben S. 111 - 116

15. ROSEN, F.S., CHARACHE, P., PENSKY, J., DONALDSON, V.: Science 148 (1965)

16. LAURELL, A.B., MARTENSSON, U.: Europ. J. Immunol. 1, 146 - 148, (1971)

17. KUEPPERS, F., BERENDES, U., SCHÖPF, E.: Humangenetik 15, 119 - 125 (1972)

15, 16, 17 aus Literaturangabe Nr. 4 S. 78 ff.

18. LAURELL, C.B., PERSSON, U.: Biochim. biophys. Acta (Amst.) 310, 500 - 507 (1973)

19. MATHIS, R.K., FREIER, E.F., HUNT, C.E., KRIVIT, W., SHARP, H.L.: New Engl. J. Med. 288, 59 - 64 (1973)

20. HEIMBURGER, N.: Biochemistry of Proteinase Inhibitors from Human Plasma: A Review of Recent Development. Aus 4., S. 14 - 22

21. RINDERKNECHT, H., GOOKAS, M.C.: Biochim. biohphys. Acta (Amst.) 295, 233 - 244 (1973)

22. HEIDE, K., HEIMBURGER, N., HAUPT, H.: Clin. Chem. Acta 11 (1965), 153

23. ASTRUP, T., STERNDORF, J.: Scand. J. clin. Lab. Invest. 7 Acta 239, (1955)

24. FAARVANG, H.J.: Acta endocr. (Kbh) 43, 484, (1963)

25. GROCHSCH, G.J., NORDSCHOW, C.D.: Intersoc. 1972, 271

26. HOCHSTRASSER, K., REICHERT, R., WERLE,E.: Z. physiol. Chem. 353, 221 - 226 (1972)

27. HOCHSTRASSER, K., REICHERT, R., SCHWARZ, S., WERLE, E.: Z. physiol. Chem. 354, 923 - 926

28. HOCHSTRASSER, K., REICHERT, R., HEIMBURGER, N.: Z. physiol. Chem. 354, 587 - 588 (1973)

29. HOCHSTRASSER, K., SCHUSTER, R., REICHERT, R., HEIMBURGER, N.: Z.physiol. Chem. 353, 1120 - 1124 (1972)

30. HOCHSTRASSER, K., FEUTH, H., STEINER, O.: Z. physiol. chem. 354, 927 - 932 (1973)

31. LIEBERMANN, I., GAWAD M.A.: Inhibitors and activators of leucocytic proteases n purulent sputum. I. Lab. Clin. Med. 77, 713 - 727 (1971)

32. FLINDT, M.L.H.: Pulmonary disease due to inhalation of derivates of bazillus subtilis containing proteologtic enzyme. Lancent (1969/I) 1177-1181

33. WUTHRICH, B., SCHWARZSPECK, M.: Asthma bronchiale nach beruflicher Exposition mit proteolytischen Enzymen (Bacillus subtilis Proteasen) Schweiz. Med. Wschr. 100 1970, 1908 - 1914

34. MILLER-ANDERSSON, M., ANDERSSON, L.-O., BORG, H.: 4 6h intern.Congr. on Thrombosis and Haemostasis (June 19 th to 22 nd 1973, Vienna, Austria) Abstract 181 p. 216

35. LOEB, J.: Arch. Sci. Physiol. 10, 129-142 (1956)

36. MÜLLERTZ, S.: Proc. Soc. exp.Biol. (N.Y.) 85, 326 - 329, (1954)

37. NILSSON, I.M., KROOK, H., STERNBY, N.H., SÖDERBERG, E., SÖDERSTRÖM, N.: Acta med. scand. 169, 323 - 337 (1961)

38. McNICOL, G.P., GALE,S.B., DOUGLAS, A.S.: Brit. med. J. 1963, 909-915

39. BENNET, N.B.: Thrombos. Diathes. haemorrh. (Stuttg.) 30, 414 (1967)

40. LAURITSEN, O.S.: Scand. J. Clin. Lab. Invest. 22, 314 - 321 (1968)

41. HEDNER, U.: Scand. J. Haemat. 11, 398 (1973)

42. HEDNER, U., NILSSON, I.M.: Thrombos. Diathes. haemorrh. (Stuttg.) 30, 414 (1973)

43. REICHERT, R., HOCHSTRASSER, K., CONRADI, G.: Untersuchungen zur Proteasenhemmkapazität des menschlichen Bronchialsekretes. Z. Pneumonologie 147 (1972), 13 - 20

44. Siehe Literaturangabe Nr. 20

45. DONALDSON, V.H., EVANS, R.R.: J. Allergy 33, 326-329 (1962)

46. WACHTER, E., HOCHSTRASSER, K., BRETZEL, G., HEINDL, S.: Kunitz-Type Proteinase Inhibitors Derived by Limited Proteolysis of the Inter- -Trypsin Inhibitor II Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., Bd. 360, S. 1297-1303

47. DIETL, T., DOBRINSKI, W., HOCHSTRASSER, K.: Human Inter- -Trypsin Inhibitor, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., Bd. 360 Seite 1313 - 1318

48. HOCHSTRASSER, K., WACHTER, E.: Kunitz-Type Proteinase Inhibitors Derived by Limited Proteolysis of the Inter- -Trypsin Inhibitor, I Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. Bd. 360, S. 1285 - 1296

49. WACHTER,E., HOCHSTRASSER, K.: Kunitz-Type Proteinase Inhibitors Derived by Limited Proteolysis of the Inter - Trypsin Inhibitor,III

50. HOCHSTRASSER, K., FEUTH, H., FALL, J. u. KEMPES, B.: (1974) Klin. Wschr. 52, 1015-1017

51. HOCHSTRASSER, K., FEUTH, H., KEMPES, B., FALL, J., WERLE, E.: (1974) Klin. Wschr. 52, 1018-1020

52. HOCHSTRASSER, K., NIEBL, J., FEUTH, H. u. LEMPART, K. (1977) Klin. Wschr. 55, 337-342

53. HOCHSTRASSER, K., NIEBL, J., LEMPART, K. (1977) Klin. Wschr. 55, 343-345

Mein herzlichster Dank geht an Herrn Prof. Dr. K. Hochstrasser für die Bereitstellung des Themas und des Laborplatzes, sowie für die umfangreiche Unterstützung.

Allen Mitarbeiterinnen von Herrn Prof. Dr. K. Hochstrasser, besonders Frl. K. Lempart, Frau S. Heindl und Frl. Rossmanith möchte ich für die vielen kleinen und großen Hilfen bei meiner Arbeit ganz herzlich danken

LEBENSLAUF

Geboren:	10.11.1953
Vater:	Eduard Korsch, geb. 26.5.1927, gestorben 5.1.1974 Beruf: Bankkaufmann
Mutter:	Irmgard Stegmayr, geb. Schulze, geschiedene Korsch, Angestellte
Bruder:	Martin Korsch, geb. 27.1.1955 Beruf: Banklehrling
1960 - 1964	Volksschule in Poppenweiler, Baden-Württemberg
1964 - 1966	Oberrealschule Miesbach
1966 - 1968	Eichendorff - Gymnasium in Bamberg
1968 - 1973	Luisengymnasium in München
1973	Abitur am Luisengymnasium
1973 - 1974	Sprachstudium in Paris an der Sorbonne
Wintersemester 1974/75	Beginn des Studiums der Zahnmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München
Oktober 1975	Vorphysikum
März, April 1977	Physikum
Dezember 1980	Staatsexamen in München